

Aus dem Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Das Ubiquitin-Proteasom-System und die Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 sind involviert in den Abbau der RNA-Polymerase II durch den Virulenzfaktor NSs des La Crosse-Virus

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Larissa Spiegelberg

aus Bedburg

Marburg, November 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 16.12.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Friedemann Weber

Korreferent: Prof. Dr. Uta-Maria Bauer

Und noch einmal: für meine Lieben

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung..... | 1 |
| 2 | Summary..... | 2 |
| 3 | Einleitung..... | 3 |
| 3.1 | Die Familie der <i>Bunyaviridae</i> | 3 |
| 3.2 | Das La Crosse-Virus | 4 |
| 3.2.1 | Transmissionszyklus und Pathogenese von LACV | 5 |
| 3.2.2 | Epidemiologie von LACV..... | 6 |
| 3.2.3 | Molekularbiologie von LACV | 6 |
| 3.2.3.1 | Morphologie von LACV | 6 |
| 3.2.3.2 | Genom und Proteine von LACV | 7 |
| 3.2.3.3 | Replikationszyklus der Bunyaviren | 9 |
| 3.3 | Das Interferonsystem..... | 13 |
| 3.3.1 | Erkennung des Virus durch zelluläre Strukturen..... | 13 |
| 3.3.2 | Interferone und Interferon-stimulierte Gene | 14 |
| 3.4 | Virale Evasionsmechanismen..... | 15 |
| 3.5 | Das NSs-Protein von LACV..... | 16 |
| 3.6 | Die zelluläre Transkription durch die RNA-Polymerase II | 19 |
| 3.6.1 | Die DNA-Schadensantwort und die zelluläre Transkription..... | 22 |
| 3.7 | Der Ubiquitin-Proteasom-abhängige Abbau von Proteinen | 23 |
| 3.7.1 | Ubiquitin, Ubiquitinylierungen und das Proteasom..... | 23 |
| 3.7.2 | Die Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4..... | 24 |
| 4 | Ziele dieser Arbeit | 27 |
| 5 | Material | 28 |
| 5.1 | Viren | 28 |
| 5.2 | Zellkultur von eukaryotischen Zellen | 28 |
| 5.2.1 | Eukaryotische Zellen | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2.2 | Reagenzien | 29 |
| 5.2.3 | Medien und Lösungen..... | 29 |
| 5.3 | Zellkultur von prokaryotischen Zellen..... | 30 |
| 5.3.1 | Prokaryotische Zellen | 30 |
| 5.3.2 | Medien und Lösungen..... | 30 |
| 5.4 | Antikörper | 31 |
| 5.4.1 | Antikörper für Western-Blot | 31 |
| 5.4.2 | Antikörper für Immunfluoreszenz..... | 31 |
| 5.5 | Oligonukleotide | 32 |
| 5.5.1 | Primer..... | 32 |
| 5.5.2 | siRNA | 34 |
| 5.6 | DNA-Plasmide..... | 34 |
| 5.7 | Enzyme und Längenstandards | 34 |
| 5.8 | Kits..... | 35 |
| 5.9 | Puffer und Lösungen | 35 |
| 5.10 | Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien | 37 |
| 5.11 | Geräte und Software..... | 39 |
| 6 | Methoden | 41 |
| 6.1 | Virologische Methoden | 41 |
| 6.1.1 | Virusproduktion..... | 41 |
| 6.1.2 | Titerbestimmung mittels Plaque-Assay | 41 |
| 6.1.3 | Virusverifizierung | 42 |
| 6.1.3.1 | Virusverifizierung via Enzymverdau..... | 42 |
| 6.1.3.2 | Virusverifizierung via Sequenzierung..... | 43 |
| 6.1.4 | Infektion von eukaryotischen Zellen | 43 |
| 6.2 | Zellkultur von eukaryotischen Zellen | 44 |
| 6.2.1 | Kultivieren von eukaryotischen Zellen | 44 |
| 6.2.2 | Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen..... | 44 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6.2.3 | Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen | 45 |
| 6.2.3.1 | Transfektion von DNA-Plasmiden | 45 |
| 6.2.3.2 | Transfektion von siRNA..... | 46 |
| 6.2.4 | Mycoplasmentest und -behandlung | 47 |
| 6.3 | Zellkultur von prokaryotischen Zellen..... | 48 |
| 6.3.1 | Herstellung von LB-Agarplatten | 48 |
| 6.3.2 | Herstellung von kompetenten DH10B-Bakterien..... | 48 |
| 6.3.3 | Transformation und Selektion von Plasmid-DNA in Bakterienzellen..... | 49 |
| 6.4 | Molekularbiologische Methoden | 49 |
| 6.4.1 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien | 49 |
| 6.4.2 | Polymerase-Ketten-Reaktion | 50 |
| 6.4.3 | DNA-Aufreinigung | 50 |
| 6.4.4 | RNA-Aufreinigung..... | 51 |
| 6.4.4.1 | RNA-Aufreinigung aus Zellen | 51 |
| 6.4.4.2 | RNA-Aufreinigung aus Zellkultur-Überständen | 51 |
| 6.4.5 | Quantitative „Real-Time-PCR“ | 51 |
| 6.5 | Proteinbiochemische Methoden..... | 53 |
| 6.5.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 53 |
| 6.5.2 | Elektrotransfer von Proteinen..... | 54 |
| 6.5.2.1 | Semidry-Western-Blot | 54 |
| 6.5.2.2 | Wet-Western-Blot..... | 54 |
| 6.5.3 | Antikörperfärbung von auf PVDF-Membran transferierten Proteinen..... | 54 |
| 6.5.4 | Entfernen von an PVDF-Membran gebundenen Antikörpern | 55 |
| 6.6 | Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse | 56 |
| 6.7 | „Ubiquitin-Pulldowns“ | 56 |
| 7 | Ergebnisse..... | 59 |
| 7.1 | Verifizierung des Abbaus von Rpb1 und der Interferon-Inhibition durch LACV WT... | 59 |
| 7.1.1 | Virusverifizierung von LACV WT und rLACVdeINs | 59 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 7.1.2 | Verifizierung des Abbaus von Rpb1 durch LACV WT..... | 61 |
| 7.1.3 | Verifizierung der Interferon-Inhibition durch LACV WT..... | 62 |
| 7.1.4 | Zeitverlauf des Rpb1-Abbaus durch LACV WT | 63 |
| 7.2 | Einfluss von LACV auf das Ubiquitin-Proteasom-System | 65 |
| 7.2.1 | Inhibition des Rpb1-Abbaus durch einen Proteasom-Inhibitor | 65 |
| 7.2.2 | Analyse des Ubiquitin-Status in LACV-infizierten Zellen mittels Pulldown..... | 66 |
| 7.2.3 | Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen..... | 67 |
| 7.2.3.1 | Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen mit Hilfe von U2OS-Ubiquitin-Zellen | 68 |
| 7.2.3.2 | Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen mit Hilfe von Ubiquitin-Verlinkungs-spezifischen Antikörpern..... | 74 |
| 7.2.4 | Analyse der Ubiquitylierung von Rpb1 in LACV-infizierten Zellen | 78 |
| 7.3 | Einfluss der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 in einer LACV-Infektion | 79 |
| 7.3.1 | Analyse des Einflusses von Nedd4 in LACV-infizierten Zellen mittels siRNA | 79 |
| 7.3.2 | Subzelluläre Verteilung von Nedd4 in LACV-infizierten Zellen | 83 |
| 7.4 | Analyse der generellen Wirtszell-Antwort auf eine LACV-Infektion mittels cDNA-Microarray | 85 |
| 7.4.1 | Heatmap-Analyse der cDNA-Microarray-Daten..... | 87 |
| 7.4.2 | Ingenuity Pathway-Analyse der cDNA-Microarray-Daten..... | 90 |
| 7.5 | Einfluss von LACV auf die 7SK-RNA | 92 |
| 7.5.1 | Induktion der 7SK-RNA durch LACV | 93 |
| 7.5.2 | Induktion der 7SK-RNA durch andere Viren..... | 94 |
| 7.5.3 | Analyse des Einflusses der 7SK-RNA in LACV-infizierten Zellen mittels siRNA ... | 96 |
| 8 | Diskussion | 98 |
| 8.1 | Einfluss von LACV auf das Ubiquitin-Proteasom-System | 98 |
| 8.1.1 | LACV-NSs induzierte generelle Poly-Ubiquitylierung und deren Verlinkung... | 98 |
| 8.1.2 | LACV-NSs induzierte Ubiquitylierung von Rpb1..... | 100 |
| 8.1.3 | Abhängigkeit von LACV vom Proteasom | 100 |

| | | |
|--|--|------------|
| 8.2 | Einfluss der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 in einer LACV-Infektion | 101 |
| 8.2.1 | Lokalisation des Abbaus von Rpb1 | 102 |
| 8.3 | Ähnlichkeiten zwischen der DNA-Schadensantwort und der LACV-NSs-Wirkungsweise | 103 |
| 8.4 | Analyse der generellen Wirtszell-Antwort auf eine LACV-Infektion | 104 |
| 8.4.1 | Mögliche Rolle der Phospholipase C, Acyl-CoA-Synthetase und des Myosins in einer LACV-Infektion | 105 |
| 8.4.2 | Einfluss der 7SK-RNA in einer LACV-Infektion | 107 |
| 8.4.3 | Bewirkt LACV-NSs einen Abbau von Rpb1 an spezifischen Promotern der angeborenen Immunantwort? | 109 |
| 8.5 | Ausblick | 110 |
| Literaturverzeichnis | | 112 |
| Abkürzungsverzeichnis | | 123 |
| Abbildungsverzeichnis- und Tabellenverzeichnis..... | | 128 |
| Anhang | | 130 |
| A. | Etablierung einer qRT-PCR für den Nachweis von endogenem und exogenem Ubiquitin in U2OS-Ubiquitin-Zellen | 130 |
| B. | Verzeichnis der akademischen Lehrer | 131 |
| C. | Publikationen und Tagungsbeiträge..... | 131 |
| Danksagung | | |

1 Zusammenfassung

Das La Crosse-Virus (LACV) gehört zu der Familie der *Bunyaviridae*, eine der größten Virusfamilien, und wird unter anderem zusammen mit dem Prototyp Bunyamwera-Virus (BUNV) und dem Schmallenberg-Virus (SBV) in das Genus der Orthobunyaviren eingeteilt. Das Virus wird durch verschiedene Moskitospezies übertragen und stellt, aufgrund der Verteilung der Moskitos, im mittleren Westen und im Osten der USA ein Gesundheitsproblem dar. LACV kann eine schwere Enzephalitis und Meningitis auslösen, vor allem in Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren. Diese führen mitunter zu weitreichenden Folgen wie Lernschwierigkeiten, kognitive Defizite, Hyperaktivität, Krämpfe und Epilepsie.

LACV gehört zu den Negativstrang-RNA-Viren mit einem tri-segmentiertem Genom und verfügt über einen Virulenzfaktor, das NSs (*non-structural protein encoded on the S segment*)-Protein, das die antivirale Interferon (IFN)-Induktion des infizierten Wirts inhibiert. Dies geschieht durch den gezielten proteasomalen Abbau der Rpb1-Untereinheit der RNA-Polymerase II (RNAPII). Ein solcher Abbau zeigt Ähnlichkeiten zu der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR), in der Rpb1 durch verschiedene Ubiquitin-E3-Ligasen ubiquitinyliert und somit dem Proteasom zugeführt wird. Hierbei spielt Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) eine tragende Rolle.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das LACV-NSs-Protein eine generelle Ubiquitinylierung induziert, die Lysin48 (K48) verlinkt ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im Speziellen die Rpb1-Untereinheit der RNAPII ubiquitinyliert wird. Zusätzlich wurde aufgezeigt, dass die Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 in den Abbau von Rpb1 involviert ist, da ein durch siRNA induzierter Nedd4-Knockdown den Abbau von Rpb1 und somit auch die Inhibition der IFN-Induktion teilweise aufhebt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation von Nedd4 durch das LACV-NSs-Protein verändert wird, da Nedd4 in LACV-NSs-exprimierenden Zellen in perinukleären Strukturen akkumuliert, während es normalerweise homogen in der Zelle verteilt ist.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die generelle Wirtszellantwort von LACV-infizierten Zellen mittels eines cDNA-Microarrays untersucht. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass das LACV-NSs-Protein spezifisch Gene des angeborenen Immunsystems inhibiert, obwohl es bis dato nur als globaler Suppressor der RNAPII bekannt war.

2 Summary

The La Crosse virus (LACV) belongs to the family *Bunyaviridae*, one of the biggest virus families, and is grouped together with the prototype Bunyamwera virus (BUNV) and for example the Schmallenberg virus (SBV) into the genus *Orthobunyavirus*. The virus is transmitted by different mosquito species and is a major health problem in the mid-western and eastern states of the US due to the prevalence of infected mosquitoes in these areas. The virus can cause severe encephalitis and meningitis, especially in children under the age of 15 years. Such an encephalitis and meningitis can result in deleterious consequences including learning disabilities, cognitive deficits, hyperactivity, seizures, and epilepsy.

LACV belongs to the negative-strand RNA viruses with a tri-segmented genome and encodes for a virulence factor, the NSs (non-structural protein encoded on the S segment) protein, which inhibits the antiviral interferon (IFN) induction of the infected host. It does this by selectively triggering the proteasomal degradation of the Rpb1 subunit of RNA polymerase II (RNAPII). This degradation shows similarities to the DNA damage response (DDR), during which Rpb1 is ubiquitinated by sequentially acting ubiquitin E3 ligases and is consequentially targeted by the proteasome. Here, the ubiquitin E3 ligase Nedd4 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) plays a major role.

The following work demonstrates that the LACV-NSs protein induces a general ubiquitinylation and that this ubiquitinylation is lysine48 (K48) linked. Furthermore, it could be shown that specifically the Rpb1 subunit of RNAPII is ubiquitinated. Moreover, it was demonstrated that the ubiquitin E3 ligase Nedd4 is involved in the degradation of Rpb1, as an siRNA-induced knock-down of Nedd4 partially rescues the degradation of Rpb1 and thus the inhibition of the IFN induction. In addition, it was shown that the subcellular localization of Nedd4 is changed by the expression of the LACV-NSs protein, from a normally homogenous distribution throughout the cell to a perinuclear localization.

Finally, a transcriptomic analysis of the general host response to LACV was performed. Surprisingly, it became evident that the LACV-NSs protein, despite being a global suppressor of RNAPII, specifically targets genes of the innate immune system.

3 Einleitung

3.1 Die Familie der *Bunyaviridae*

Mit mittlerweile über 350 Mitgliedern stellt die Familie der *Bunyaviridae* eine der größten Virusfamilien dar (Hollidge *et al.*, 2010). Der Name „Bunya“ leitet sich von „Bunyamwera“ ab, ein Ort in Uganda, in dem 1943 zum ersten Mal ein Bunyavirus isoliert worden ist (Bunyamwera-Virus, BUNV). BUNV ist gleichzeitig der Prototyp der Bunyaviren; es ist das Bunyavirus, dessen Genom zum ersten Mal komplett sequenziert worden ist (Elliott, 1989a; Elliott, 1989b; Lees *et al.*, 1986) und es ist das erste segmentierte Negativstrang-RNA-Virus, das durch Transfektion von cDNA-Plasmiden artifiziell in Zellkultur hergestellt worden konnte (Bridgen & Elliott, 1996).

Die Familie der *Bunyaviridae* wurde 1975 offiziell deklariert und in fünf Genera unterteilt (siehe Tabelle 3.1). Diese wiederum werden in unterschiedliche Serogruppen (Viren, die aufgrund ihrer Reaktivität in serologischen Tests miteinander verwandt sind) eingeteilt. Vier Genera sind sogenannte Arboviren (*arthropod-borne viruses*), das heißt sie werden durch die Stiche und Bisse von Arthropoden übertragen. Eine Ausnahme ist das Genus der Hantaviren, dessen Vertreter über die Exkremente von infizierten Nagetieren übertragen werden. Bis auf die Tospoviren, die ausschließlich pflanzenpathogen sind, infizieren alle anderen Bunyaviren Säugetiere und verursachen sowohl im Menschen als auch im Tier milde bis schwere Erkrankungen wie Fieber, Kopfschmerzen, akute Atemwegserkrankungen, Enzephalitis, hämorrhagische Fieber, Missbildungen und Aborte (siehe Tabelle 3.1). Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung wurde bislang nur für das Andes-Virus (ANDV) und das Krim-Kongo-hämorrhagisches-Fieber-Virus (*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, CCHFV) beobachtet (Mardani *et al.*, 2009; Padula *et al.*, 1998).

Das Vorkommen der einzelnen Bunyaviren hängt von der Verbreitung des jeweiligen Vektors ab, welche sich durch den Klimawandel jedoch kontinuierlich verändert. Das Potential dieser Viren auch an neuen Orten aufzutreten zeigt sich in der Entwicklung und Verbreitung des Schmallenberg-Virus (SBV), das 2011 erstmals in Deutschland aufgetreten ist und sich seitdem in ganz Europa verbreitet hat (Afonso *et al.*, 2014).

Tabelle 3.1: Ausgewählte Pathogene der Familie der *Bunyaviridae*

NA: Nordamerika, SA: Südamerika, AF: Afrika, AS: Asien, AU: Australien, IH: Iberische Halbinsel, EU: Europa, OE: Osteuropa, WE: Westeuropa. Modifiziert nach Acheson, Fundamentals of molecular virology.

| Genus und Virus | Wirt und Erkrankung | Vektor | Vorkommen |
|--|---|----------------|------------|
| Orthobunyavirus | | | |
| La Crosse-Virus | Mensch: Enzephalitis | Moskitos | NA |
| Schmallenberg-Virus | Wiederkäuer: Fieber, Fehlbildungen bei Neugeborenen | Gnitzen | EU |
| Oropouche-Virus | Mensch: Fieber | Mücken | SA |
| Phlebovirus | | | |
| Rift-Valley-Fieber-Virus | Mensch: Enzephalitis, hämorrhagisches Fieber, Retinitis Wiederkäuer: Hämorrhagien, nekrotische Hepatitis, Fehlgeburten | Moskitos | AF, IH |
| Sandfliegen-Fieber-Virus | Mensch: Fieber | Sandfliegen | EU, AF, AS |
| Nairovirus | | | |
| Krim-Kongo-hämorrhagisches-Fieber-Virus | Mensch: hämorrhagisches Fieber | Zecken | OE, AF, AS |
| Hantavirus | | | |
| Hantaan-Virus | Mensch: schweres HFRS (<i>hemorrhagic fever with renal syndrome</i>) | Feldmaus | OE, AS |
| Puumala-Virus | Mensch: mildes HFRS | Rötelmaus | WE |
| Andes-Virus | Mensch: HPS (Hantavirus-pulmonales-Syndrom) | Zwergseieratte | SA |
| Tospovirus | | | |
| Tomatebronzeflecken-Virus | Über 650 Pflanzenspezies: verschiedene Symptome | Fransenflügler | weltweit |

3.2 Das La Crosse-Virus

Das La Crosse-Virus (LACV) gehört zu dem Genus der Orthobunyaviren, dem mit über 48 Spezies und 170 Virusmitgliedern größten Genus der *Bunyaviridae*, und wird eingeteilt in die Kalifornien-Serogruppe. Erstmals isoliert wurde es 1963 aus dem Gehirn eines 4-Jahre alten Mädchens, das 1960 an einer LACV-Enzephalitis gestorben war (Thompson *et al.*, 1965).

3.2.1 Transmissionszyklus und Pathogenese von LACV

Normalerweise befindet sich das Virus in einem Zyklus zwischen seinem Vektor, den Moskito-Arten *Aedes triseriatus* und *Aedes albopictus*, und seinem Säugetierwirt, wie den Backenhörnchen *Tamias striatus* und den Eichhörnchen *Sciurus carolinensis* (Borucki *et al.*, 2002). Hierbei infizieren sich saugende Moskito-Weibchen, wenn sie einen infizierten Säugetierwirt stechen. Das Virus wandert vom Darm der Moskitos zum Hämözöl und von dort in alle Organe. Die Verbreitung des Virus in die Speicheldrüsen der Moskitos ist besonders wichtig, da das Virus von dort an die Säugetierwirte durch einen Biss der Moskitos weitergegeben wird, wobei der Moskitospeichel die Transmission des Virus enorm steigert (Borucki *et al.*, 2002). Die Infektion der Moskitos ist persistent und verläuft ohne Krankheitserscheinungen, jedoch scheint eine Infektion sie in ihrem Ess- und Fortpflanzungsverhalten zu beeinflussen (Jackson *et al.*, 2012; Reese *et al.*, 2009). Innerhalb der Moskitos wird das Virus von Eltern zu Nachkommen über infizierte Eier (vertikale/ transovariale Transmission, TOT) weitergegeben. Dadurch wiederum können männliche Moskitos das Virus durch die Fortpflanzung an weibliche Moskitos weitergeben (horizontale Transmission). Auch in den Säugetierwirten verläuft eine Infektion symptomlos, obwohl die viralen Titer sehr hoch sind (Borucki *et al.*, 2002).

Neben den eigentlichen Säugetierwirten können auch Menschen durch den Biss eines infizierten Moskitos mit LACV infiziert werden. LACV gelangt in die Muskeln, wo es zu hohen Titer heranwächst, was in einer hohen Virämie (hohe Viruslast im Blut) resultiert. Das Virus infiziert fast alle Organe des Menschen und kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden, so dass Neuronen infiziert werden können. Dadurch kann sich eine schwere Enzephalitis und Meningitis entwickeln; die Inzidenz ist am höchsten in Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren (Bennett *et al.*, 2008; Borucki *et al.*, 2002). Eine schwere Erkrankung besonders in jungen Jahren ist sehr wahrscheinlich auf die noch nicht vollständige Entwicklung des Immunsystems zurückzuführen. Auch säugende Mäuse sind hochsensibel für eine Infektion mit LACV, wohingegen ausgewachsene Mäuse während einer Infektion (die peripher, nicht interkranial induziert wurde) symptomlos sind. Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Antwort von myeloiden dendritischen Zellen (*myeloid dendritic cells*, mDCs) zwischen jungen und erwachsenen Mäusen bei der Anfälligkeit für eine LACV-induzierte neurologische Erkrankung eine Rolle spielen (Taylor *et al.*, 2014).

Die Inkubationszeit beträgt zwischen drei und acht Tagen. Danach tritt plötzlich Fieber auf, hinzu kommen Kopf-, Gelenk- und Muskelschmerzen. In seltenen Fällen manifestiert sich wie oben erwähnt die Entzündung des Gehirns, wobei die Fatalitätsrate bei 1 - 2 % liegt; nichtsdestotrotz müssen 57 % der jungen Patienten intensiv-medizinisch behandelt werden. In 10 % der Fälle

treten Langzeitschäden wie Lernschwierigkeiten, kognitive Defizite, Hyperaktivität, Krämpfe und Epilepsie auf (Borucki *et al.*, 2002).

3.2.2 Epidemiologie von LACV

Die Inzidenz von LACV-induzierten Erkrankungen in endemischen Regionen ist mit 5 - 10 Fällen pro 100.000 Einwohner vergleichbar mit der Inzidenz von allgemeiner bakterieller Meningitis (Pavlovic *et al.*, 2000). Man geht davon aus, dass es mehrere hunderttausend asymptomatische Erkrankungen pro Jahr gibt (Haddow & Odoi, 2009). Die Inzidenz steigt in den Sommermonaten Juni, Juli und August stark an, da in dieser Zeit die Zahl der Moskitos am höchsten ist (Borucki *et al.*, 2002). In den Wintermonaten kann das Virus in den Eiern von infizierten Moskitos persistieren, so dass im Frühjahr der Transmissionszyklus von Neuem beginnen kann (Borucki *et al.*, 2002; Thompson & Beaty, 1977).

Endemische Regionen sind die mittleren westlichen Staaten wie Iowa, Illinois, Indiana, Minnesota, Wisconsin und Ohio und östliche Teile der USA wie West Virginia, Kentucky, Tennessee und North-Carolina (Borucki *et al.*, 2002). Die Verteilung der endemischen Regionen ist gekoppelt an das Auftreten der Mosquito-Vektoren. Hierbei führt die globale Erwärmung dazu, dass *Aedes triseriatus* sich weiter verteilen kann. Weiterhin verbreitet sich *Aedes albopictus*, der wahrscheinlich durch den Import von Reifen aus Asien in die USA gelangte, sehr schnell und ist schon jetzt in vielen Regionen der Erde endemisch (Gerhardt *et al.*, 2001; Grimstad *et al.*, 1989; Moore & Mitchell, 1997).

Eine Impfung gibt es derzeit noch nicht. Allerdings wurden im experimentellen Tiermodell Vakzinierungen gegen LACV durchgeführt; hierbei zeigte unter anderem ein DNA-Plasmid, das für die Glykoproteine Gn und Gc kodiert und das intramuskulär in Mäuse injiziert wurde, einen Erfolg (Pavlovic *et al.*, 2000).

3.2.3 Molekularbiologie von LACV

3.2.3.1 Morphologie von LACV

LACV bildet sphärische, von einer aus dem Golgi-Netzwerk stammenden Lipidmembran umhüllte Partikel, die im Durchmesser circa 90 - 100 nm groß sind. In die Lipidhülle eingebettet sind

die Glykoproteine Gn und Gc. Innerhalb der Partikel befindet sich das virale Genom, das insgesamt 12,4 Kilobasen (kb) groß ist und aus drei unterschiedlich großen RNA-Segmenten besteht, die einzelsträngig (*single-stranded*, ss) und negativ-orientiert sind. Sie bestehen jeweils aus einer kodierenden und 3'- und 5'-flankierenden Regionen, die UTRs (*untranslated regions*) genannt werden. Die Segmente werden ihrer Größe nach benannt: S für *small*, M für *medium* und L für *large* (siehe Abbildung 3.1). Die Genomsegmente werden von dem Nukleoprotein N (N-Protein) enkapsidiert und sind assoziiert mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L (L-Protein). RNA und Proteine bilden somit einen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex, der in helikaler Symmetrie vorliegt. Da beide Enden der RNA-Segmente zueinander komplementär sind, können die Enden sogenannte „Pfannenstielstrukturen“ (*panhandle structures*) ausbilden und bilden damit nicht-kovalent geschlossene zirkuläre RNAs (siehe Abbildung 3.1). Diese komplementären Sequenzen sind innerhalb eines Genus hochkonserviert und dienen als Promoter für die Transkription und Replikation (Barr *et al.*, 2003; Barr & Wertz, 2005; Kohl *et al.*, 2004). Weiterhin sind sie verantwortlich für die Enkapsidierung der RNA durch das N-Protein, die Termination der Transkription und die Verpackung des viralen Genoms in neu-gebildete Virionen (Barr *et al.*, 2006; Blakqori *et al.*, 2012; Kohl *et al.*, 2006; Osborne & Elliott, 2000).

3.2.3.2 Genom und Proteine von LACV

L-Segment:

Das L-Segment ist circa 6,9 kb groß und kodiert für das L-Protein, welches sowohl die mRNA (*messenger RNA*) herstellt als auch das virale Genom vervielfältigt (Endres *et al.*, 1989). Das L-Protein hat ein Molekulargewicht von circa 250 kDa.

Die viralen mRNAs sind nicht polyadenyliert und werden initiiert mit Primern, die durch das sogenannte „Cap-Snatching“ durch das L-Protein entstanden sind. Der N-Terminus des L-Proteins ist eine Cap-abhängige Endonuklease, mit der zelluläre mRNAs 12 - 18 Nukleotide hinter dem 5'-Ende geschnitten werden, um sie als Primer für die Initiation der viralen mRNA-Synthese zu verwenden (Patterson *et al.*, 1984; Reguera *et al.*, 2010). Den Vorgang des Cap-Snatching findet man beispielsweise auch bei Influenzaviren (Plotch *et al.*, 1981).

M-Segment:

Das M-Segment hat eine Größe von circa 4,5 kb und kodiert für insgesamt drei Proteine: die Glykoproteine Gn und Gc und das Nichtstrukturprotein NSm (*non-structural protein encoded on the M segment*).

Die beiden Glykoproteine werden als Vorläuferpolyprotein hergestellt und werden entsprechend ihrer Position im Polyprotein benannt: Gn, das kleinere von beiden mit circa 32 kDa, liegt im N-Terminus, Gc, das mit circa 100 kDa größere Protein, im C-Terminus des Polyproteins. Das Polyprotein wird während der Translation und des Transports in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) gespalten und mittels Glykosylierungen modifiziert; danach wird ein Gn/Gc-Dimer zum Golgi-Apparat transportiert, wo es bis zur Viruszusammensetzung verbleibt. Die Glykoproteine, die Typ-I-Membranproteine sind, sind unter anderem verantwortlich für die Hämagglutination, die Virulenz, die Gewebespezifität und die Zellfusion. Weiterhin ist, im Falle von Orthobunyaviren, vor allem das Gc-Protein Ziel von inhibierenden monoklonalen Antikörpern.

Das NSm-Protein, welches circa 18 kDa groß ist, entsteht in den verschiedenen Bunyaviren auf unterschiedliche Art und Weise. Im Falle von LACV ist es Teil des auf dem M-Segment kodierten Polyproteins und wird abgespalten, im Falle der Tospoviren hingegen wird es durch eine sogenannte „ambisense-Strategie“ kodiert, das heißt es wird von einer subgenomischen RNA translatiert. Die Funktion des LACV-NSm-Proteins ist noch unbekannt; im Falle von BUNV ist das NSm-Protein mitverantwortlich für die Viruszusammensetzung und die Morphogenese (Shi *et al.*, 2006).

S-Segment:

Das S-Segment, welches circa 1 kb groß ist, kodiert zum einen für das N-Protein und im Falle der (meisten) Ortho-, Phlebo- und Tospoviren für das NSs (*non-structural protein encoded on the S segment*)-Protein. Im Falle der Orthobunyaviren werden beide Proteine von derselben mRNA synthetisiert; dafür befinden sie sich in unterschiedlichen, überlappenden Leserahmen (Fuller *et al.*, 1983). Im Gegensatz dazu wird das NSs-Protein der Phlebo- und Tospoviren durch die ambisense-Strategie kodiert (siehe oben).

Das N-Protein, circa 26 kDa groß, enkapsidiert virale Genom- und Antigenom-RNA und nur in dieser Form kann die RNA transkribiert und repliziert werden. Neben der Interaktion mit der RNA interagiert es auch noch mit sich selber, dem L-Protein und den beiden Glykoproteinen (Barr *et al.*, 2006; Blakqori *et al.*, 2012; Kohl *et al.*, 2006; Osborne & Elliott, 2000).

Das NSs-Protein, mit circa 11 kDa das kleinste Protein des Virus, ist ein wichtiger Virulenzfaktor und wird in Kapitel 3.5 detaillierter beschrieben.

Eine schematische Abbildung des Viruspartikels und der Kodierungsstrategie von LACV befindet sich im Folgenden.

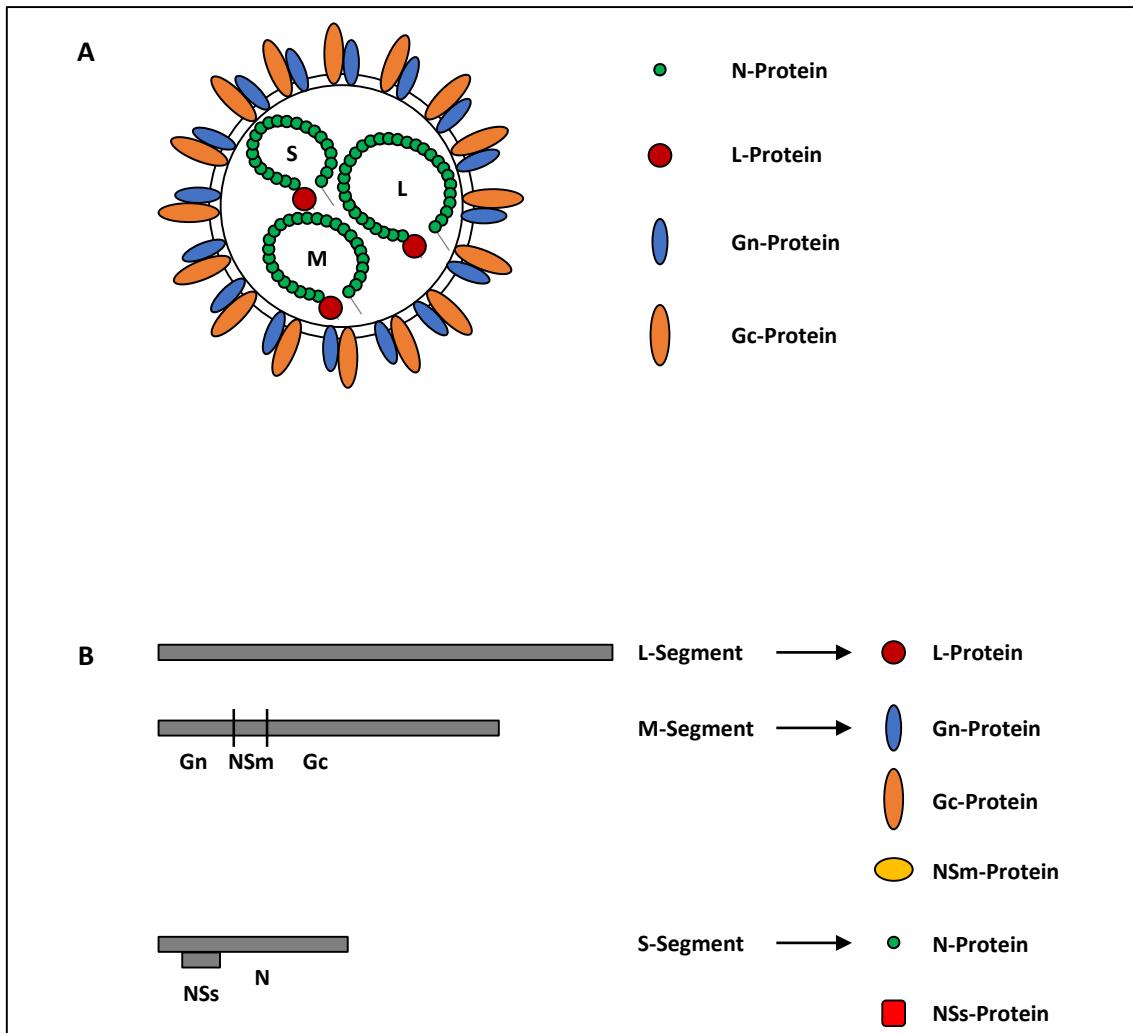


Abbildung 3.1: Schematische Abbildung eines LACV-Partikels und Kodierungsstrategie des Virus

A. Das Virion wird umhüllt von einer Doppellipidmembran, in die die Glykoproteine Gn und Gc eingelagert sind. Im Innern des Virions befinden sich die drei Nukleokapside (L, M und S), bestehend aus der einzelsträngigen, negativ-orientierten RNA, dem N-Protein und dem L-Protein. **B.** Das L-Segment (6980 Nukleotide, nt) ist das größte Segment und kodiert für das größte Protein des Virus, das L-Protein. Das M-Segment (4526 nt) kodiert für ein Polypeptid, bestehend aus den beiden Glykoproteinen Gn und Gc und dem NSm (*non-structural protein encoded on the M segment*)-Protein. Das S-Segment (984 nt) kodiert für das N-Protein und, in einem überlappenden Leserahmen, für das NSs (*non-structural protein encoded on the S segment*)-Protein. Modifiziert nach Acheson, Fundamentals of molecular virology.

3.2.3.3 Replikationszyklus der Bunyaviren

Da viele Daten, die über den Replikationszyklus der Bunyaviren gesammelt wurden, nicht nur von Untersuchungen von LACV, sondern auch von Untersuchungen anderer Bunyaviren kommen, soll hier exemplarisch der allgemeine Replikationszyklus von Bunyaviren erläutert werden.

Eintritt in die Zelle:

LACV kann viele verschiedene Zelltypen infizieren. Der zelluläre Rezeptor ist derzeit noch nicht bekannt, wobei gezeigt wurde, dass das Germiston-Virus, ebenfalls ein Virus aus dem Genus der

Orthobunyaviren, DC-SIGN (*dendritic-cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin*) als Rezeptor benutzt (Lozach *et al.*, 2011). Nach der Bindung an den zellulären Rezeptor von Säugerzellen wird das Virus über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und gelangt mit Hilfe von Rab5 (*Ras-related protein Rab5*) in frühe Endosomen (Elliott, 2014; Hollidge *et al.*, 2012). Durch eine Ansäuerung des pHs im frühen Endosom kommt es zu einer Konformationsänderung des Gn-Proteins, so dass dadurch die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran stattfinden kann. Dadurch werden die Nukleokapside in das Zytoplasma freigesetzt.

Transkription:

Im Zytoplasma findet dann die virale Transkription statt. Hierbei werden die viralen Genomsegmente durch das L-Protein in mRNA transkribiert. Dafür wird der Vorgang des Cap-Snatching verwendet, der in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben wurde und für den fertige, aus dem Nukleus transportierte, zelluläre mRNAs, die sich im Zytoplasma in großer Anzahl befinden und die über einen langen Zeitraum stabil sind, benutzt werden.

Translation:

Das Vorhandensein eines Caps am 5'-Ende der Transkripte erlaubt eine Bindung an Ribosomen und eine daraus folgende Proteinsynthese. Es wurde gezeigt, dass eine Synthese von mRNAs mancher Bunyaviren von einer andauernden Translation abhängt (Bellocq & Kolakofsky, 1987; Vialat & Bouloy, 1992), da ohne Translation viele unfertige mRNAs hergestellt werden. Man vermutet, dass die Ribosomen, die sich in 5'-3'-Richtung an der wachsenden mRNA entlang bewegen, Interaktionen zwischen der wachsenden mRNA und der viralen Genom-RNA lösen, die ansonsten die Transkriptionselongation verlangsamen oder stoppen würden (Bellocq & Kolakofsky, 1987; Patterson *et al.*, 1984; Vialat & Bouloy, 1992). Aufgrund der fehlenden Polyadenylierung am 3'-Ende ist eine Translationsinitiation ohne das PolyA-bindende Protein (PABP) möglich.

Replikation:

Man geht davon aus, dass die Menge an hergestelltem N-Protein den Übergang von der Transkription zur Replikation bestimmt (Hacker *et al.*, 1989). Die Herstellung von neuer viraler RNA (vRNA) benötigt die Synthese einer Positivstrang-RNA, dem sogenannten Antigenom oder Replikationsintermediat. Das Antigenom ist eine exakte Kopie des Genoms (*copy RNA*, cRNA), ohne

Primer am 5'-Ende. Es wird durch das N-Protein enkapsidiert und wahrscheinlich führt diese Enkapsidierung dazu, dass eventuelle Sekundärstrukturen in der RNA gar nicht erst gebildet werden, die ansonsten als Terminationssignale von dem L-Protein erkannt werden können. Somit kann das L-Protein bis zum Ende des viralen Genoms das Antigenom kopieren.

Zusammensetzung und Freisetzung der Virionen:

Die Zusammensetzung der Virionen erfolgt an den Membranen des Golgi-Apparats. Hier akkumulieren die viralen Glykoproteine und verursachen eine Vakuolisierung. Virale Nukleokapside sammeln sich an der zytoplasmatischen Seite in den Regionen des Golgi-Apparats, wo sich die Glykoproteine befinden. Eine direkte Interaktion der Glykoproteine mit dem RNP-Komplex ist nötig für das Abknospen in die Zisternen des Golgi-Apparats (Shi *et al.*, 2007) und Vesikel, die Virionen enthalten, werden durch Exozytose zur Zelloberfläche gebracht, so dass die Virionen in den Zwischenzellraum freigesetzt werden (Kuismanen *et al.*, 1982; Salanueva *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2010). Nach der Freisetzung erfolgt ein weiterer Reifungsvorgang, bei dem die Glykoproteine nochmals modifiziert werden (Novoa *et al.*, 2005b; Salanueva *et al.*, 2003).

Eine schematische Darstellung des Replikationszyklus der Bunyaviren befindet sich in Abbildung 3.2.

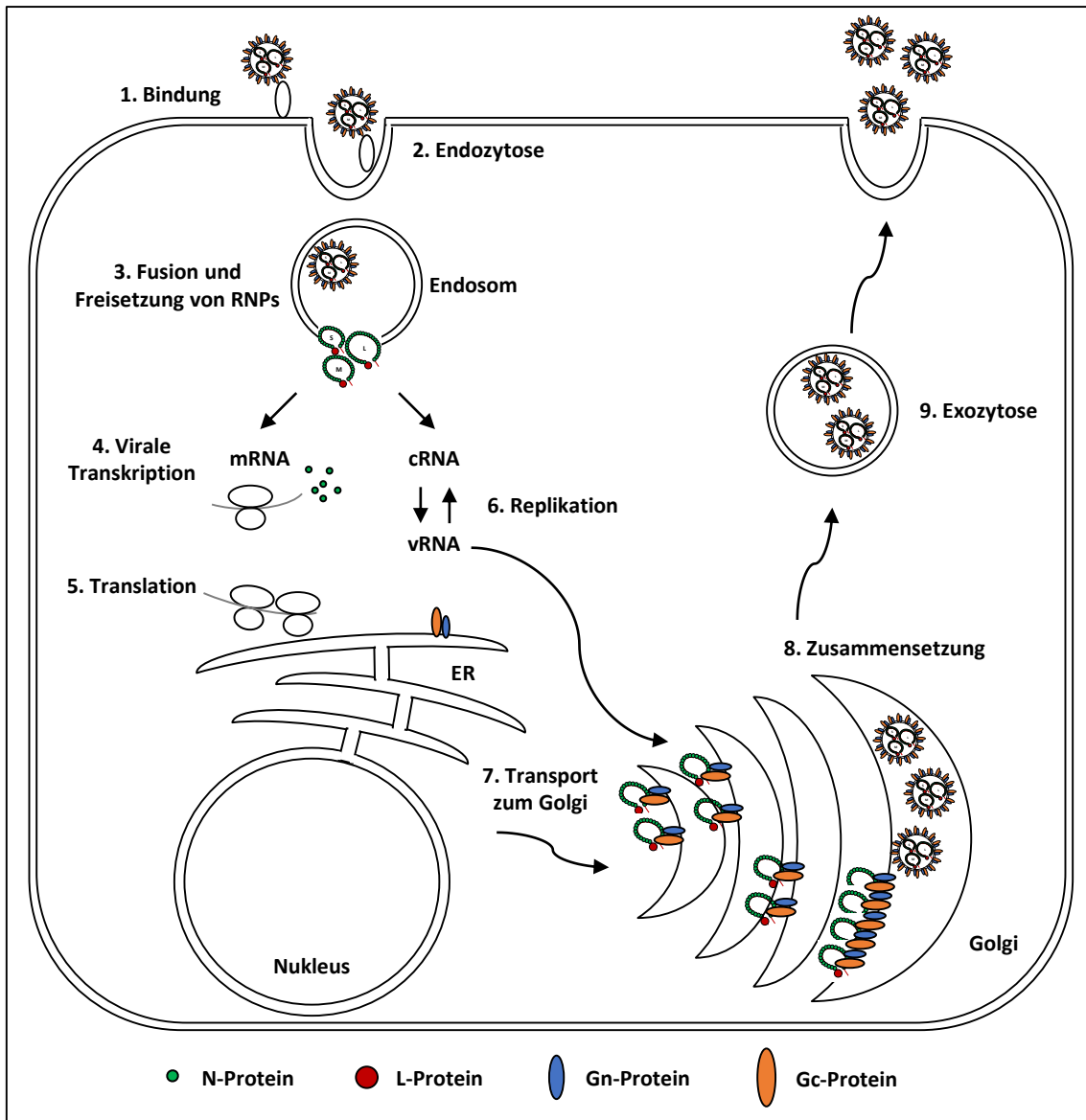


Abbildung 3.2: Schematische Abbildung des Replikationszyklus der Bunyaviren

1. Durch eine Interaktion der Glykoproteine des Virus mit einem, im Falle von LACV, bis jetzt noch unbekannten zellulären Rezeptor kommt es zu der Bindung des Virus an die Zelloberfläche. **2.** Es kommt dann zur Clathrin-vermittelten Endozytose. **3.** Durch eine Ansäuerung des pHs im frühen Endosom wird die Konformation der Glykoproteine in der Weise geändert, dass eine Fusion der viralen mit der endosomalen Membran stattfinden kann. **4.** Die Ribonukleokapside (RNPs) werden in das Zytoplasma entlassen, wo die virale Transkription stattfindet. **5.** Die neu hergestellten Transkripte werden in Proteine translatiert. Das M-Polypeptid wird während der Translation gespalten und die beiden Glykoproteine dimerisieren im endoplasmatischen Retikulum (ER). **6.** Ist ausreichend N-Protein hergestellt worden, beginnt die Replikation, bei der mit Hilfe eines Replikationsintermediats (cRNA) die virale RNA (vRNA) synthetisiert wird. **7.** Alle Strukturproteine und die RNPs werden zum Golgi-Apparat transportiert. **8.** Hier werden Virion-enhaltende Vesikel gebildet. **9.** Diese werden dann mittels Exozytose in den Extrazellulärraum freigesetzt, wo neue Zellen infiziert werden können. mRNA: messenger RNA, cRNA: copy RNA. Modifiziert nach Fields, Virology.

3.3 Das Interferonsystem

3.3.1 Erkennung des Virus durch zelluläre Strukturen

Nach Eintritt eines Virus in eine Zelle reagiert diese sehr schnell mit Hilfe einiger spezifischer Faktoren der angeborenen Immunantwort, die hier für den Fall der RNA-Viren näher erläutert werden sollen.

Bestimmte Strukturen, sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) werden durch PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt (Ablasser *et al.*, 2009; Kawasaki *et al.*, 2011; Randall & Goodbourn, 2008; Weber & Weber, 2014a; Weber & Weber, 2014b). Diese PAMPs sind zumeist virale Nukleinsäuren, die in einer anderen Struktur vorliegen als die herkömmlichen zellulären Nukleinsäuren und die normalerweise nicht in einer Zelle vorhanden sind.

Bekannte PRRs sind die sogenannten TLRs (*Toll-like receptors*), die für die Viruserkennung in Endosomen zuständig sind. Hierbei erkennt TLR3 doppelsträngige (ds) RNA und TLR7 und TLR8 erkennen einzelsträngige (*single-stranded*, ss) RNA. Weiterhin gibt es die zytoplasmatischen Helikasen RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated factor 5*). Diese Helikasen sind Teil der RLR (*RIG-I-like receptor*)-Familie, zu der auch noch LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) gehört. In Transfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass RIG-I lange dsRNA, kurze dsRNA mit einem 5'-Triphosphat-Ende und Poly-U/UC-reiche Sequenzen erkennt (Binder *et al.*, 2011; Hornung *et al.*, 2006). Für die natürliche Virusinfektion wurde gezeigt, dass RIG-I direkt auf in die Zelle kommende, enkapsidierte RNA-Virus-Genome reagiert, wobei das 5'-Triphosphat-Ende und die dsRNA-Pfannenstielstruktur des Genoms benötigt werden (Weber *et al.*, 2013). MDA5 erkennt verzweigte dsRNA-Strukturen (Kato *et al.*, 2008; Pichlmair *et al.*, 2009).

Die Aktivierung dieser PRRs führt im Falle der RLRs zu einer Signalkaskade über MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*, auch IPS-1, *interferon- β promoter stimulator protein-1*, genannt), im Falle der TLRs über TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) und Myd88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) zu TRAF (*TNF receptor associated factor*)-Proteinen. Diese führen letztendlich zu der Aktivierung von NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells*), ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der zum einen das Interferon (IFN)- β -Gen positiv reguliert als auch für die Transkription von vielen anderen Genen wichtig ist (Haller *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2011; Yoneyama & Fujita, 2010). Des Weiteren führt

TRAF3 zu der Aktivierung von IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*), das als Homodimer in den Nukleus eintritt (Belgnaoui *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2011) und dort die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen, TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und IFN- β aktiviert (Kato *et al.*, 2008; Kawasaki *et al.*, 2011). Die Interferone werden im folgenden Kapitel eingehender erläutert.

Für die Aktivierung des IFN-Systems ist das Ubiquitin-Proteasom-System unerlässlich (Oudshoorn *et al.*, 2012). So wird zum Beispiel RIG-I durch Ubiquitin-E3-Ligasen reguliert und auch die Aktivierung von NF- κ B hängt von der Ubiquitinylierung und dem anschließenden Abbau seiner Inhibitoren ab (Oudshoorn *et al.*, 2012).

3.3.2 Interferone und Interferon-stimulierte Gene

Interferone (IFNs) gehören in die Gruppe der Zytokine und sind ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems, spielen aber auch in der adaptiven Immunantwort eine große Rolle. Sie werden unterteilt in drei Klassen: Typ-I-IFN, zu der das IFN- α und das IFN- β zählt, Typ-II- und Typ-III-IFN.

Das IFN- β -Protein wird im Zuge einer Antwort auf eine virale Infektion hergestellt und sezerniert, wonach es sowohl autokrin als auch parakrin auf Zellen einwirkt und die Expression von IFN- α und von sogenannten ISGs (IFN-stimulierte Gene) induziert. Hierzu werden STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Proteine aktiviert, die als Transkriptionsfaktoren die Transkription von Hunderten von ISGs fördern. ISGs sind antiviral und greifen entweder direkt in den viralen Lebenszyklus ein oder modulieren antivirale Signalkaskaden (Haller *et al.*, 2006; Yoneyama & Fujita, 2010).

ISGs wirken auch auf Bunyaviren. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die GTPase MxA das LACV-N-Protein binden kann und es in zytoplasmatischen Inklusionen sequestriert, wodurch eine effiziente Ribonukleoprotein (RNP)-Bildung nicht mehr möglich ist (Kochs *et al.*, 2002). Die Proteinkinase R (*protein kinase RNA-activated*, PKR) wird durch dsRNA aktiviert, was in der Phosphorylierung von eIF2 α (eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 α) und somit in der Inhibition der zellulären Translation resultiert. PKR ist beispielsweise gegen das Bunyamwera-Virus (BUNV) aktiv und inhibiert es. Viperin (*virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible*) ist ein Protein, das den Lipidhaushalt der Zelle stört und dadurch die Abknospung von Viren oder die Bildung von Virus-Replikationskomplexen verhindern kann. Auch auf BUNV scheint es inhibierend zu wirken (Carlton-Smith & Elliott, 2012).

ISG56 (auch IFIT1, *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*, genannt) wird nach PAMP-Erkennung durch PRRs induziert und bindet 2'-O-unmethylierte gecappte RNA, eine RNA-Form, die häufig von Viren hergestellt wird. Das Sequestrieren dieser RNA inhibiert die Bindung von eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren, so dass die Translation gehemmt wird (Abbas *et al.*, 2013; Diamond & Farzan, 2013; Habjan *et al.*, 2013; Pichlmair *et al.*, 2011).

IFN stimuliert auch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-1, 6 und 12 und TNF- α , die Entzündungsreaktionen und somit die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen vermitteln. Dadurch wird dann die adaptive Immunantwort initiiert.

3.4 Virale Evasionsmechanismen

Viren haben eine Vielzahl an Strategien entwickelt, um der Erkennung durch die Wirtszelle und der Induktion von antiviralen Genen zu entgehen. Sie können die Erkennung von PAMPs verhindern, indem sie Membranstrukturen in der Zelle formieren, in denen die RNA-Replikation und Transkription stattfindet (Brass *et al.*, 2009; Knoop *et al.*, 2008; Novoa *et al.*, 2005a; Overby & Weber, 2011). Weiterhin können Viren mit Hilfe von RNP-Komplexen RNA maskieren (Weber *et al.*, 2006) oder mit Hilfe von Nukleasen das 5'-Triphosphat-Ende der RNAs entfernen (Habjan *et al.*, 2008). Viele Faktoren der IFN-Signalkaskade werden gebunden, um sie zu inhibieren (Childs *et al.*, 2007; Goodbourn & Randall, 2009; Mibayashi *et al.*, 2007), andere werden abgebaut (Barro & Patton, 2007; Li *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2005b; Pfaller & Conzelmann, 2008). Des Weiteren können beispielsweise Proteine hergestellt werden, die dem IFN-Rezeptor IFNAR (IFN- α/β -Rezeptor) ähneln und somit IFN daran hindern, an den richtigen Rezeptor zu binden (Chang *et al.*, 2009; Myskiw *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Ein weiterer Mechanismus der viralen Evasion ist die Inhibition der zellulären Transkription und/oder der zellulären Translation. Vor allem auf die Transkription sind RNA-Viren nicht angewiesen, da sie ihre eigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerasen besitzen, so dass viele NSs-Proteine der Bunyaviren die zelluläre Transkription beeinflussen. So wurde für das Phlebovirus Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) gezeigt, dass das NSs-Protein mit TFIIF (Transkriptionsfaktor IIF) interagiert, um die zelluläre Transkription zu inhibieren. Hierbei sequestriert das RVFV-NSs-Protein die Untereinheiten p44 und XBP (X-Box-bindendes Protein) von TFIIF (Le May *et al.*, 2004). Die p62-Untereinheit wird durch das F-Box-Protein FBXO3 abgebaut (Kainulainen *et al.*, 2014). Weiterhin

interagiert das RVFV-NSs-Protein mit SAP30 (Sin3A-assoziiertes Protein, 30 kDa) und verhindert somit die Aktivierung des IFN- β -Promoters (Le May *et al.*, 2008). Das NSs-Protein von BUNV interagiert mit Med8 (*mediator complex subunit 8*), welches als Teil einer Ubiquitin-E3-Ligase die RNA Polymerase II (RNAPII) dem Proteinabbau zuführt (Brower *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2006). Auch LACV nimmt entscheidenden Einfluss auf die Transkription der Wirtszelle, näher erläutert wird dies im folgenden Kapitel.

3.5 Das NSs-Protein von LACV

Wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, befindet sich das Gen für das NSs-Protein von LACV auf dem S-Segment und liegt innerhalb des N-Protein-Gens. Es wird durch eine alternative Initiation („frameshift“) an einem anderen Startcodon hergestellt und ist circa 11 kDa groß. Das LACV-NSs-Protein ist ein wichtiger Virulenzfaktor (Blakqori *et al.*, 2007). Mit Hilfe von reverser Genetik wurde ein rekombinantes LACV hergestellt, das eine Mutation innerhalb des S-Segments besitzt, wodurch das NSs-Protein nicht mehr exprimiert wird (Blakqori & Weber, 2005). Da sich das NSs-Gen innerhalb des N-Protein-Gens befindet, konnte es nicht auf klassische Weise deletiert werden, weswegen man die beiden ATG-Startcodons des NSs-Gens zu zwei ACG-Codons mutiert hat. Weiterhin wurde das dritte Codon, TCG, zu einem TAG-Stoppcodon mutiert (Blakqori & Weber, 2005; siehe Abbildung 3.3 A). Diese Mutationen haben keinen Einfluss auf die Synthese des N-Proteins. Da diese rekombinante Virusmutante nicht in der Lage ist, das NSs-Protein herzustellen, wurde sie „rLACVdelNSs“ genannt (in den Abbildungen in dieser Dissertation immer als „delNSs“ bezeichnet). Das Virus wächst in IFN-kompetenten Zellen zu signifikant geringeren Titern als das wildtypische (WT) rLACV; weiterhin ist es in der Infektion von Mäusen im Vergleich zum Wildtyp attenuiert (Blakqori *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu kann rLACVdelNSs in MEF (*mouse embryonic fibroblast*)-Zellen, die keinen IFN-Rezeptor besitzen, zu gleichen Titern heranwachsen wie das WT-Virus (Blakqori *et al.*, 2007). Das rLACVdelNSs ist ein potenter IFN-Induktor, wohingegen das WT-Virus die IFN-Produktion effizient hemmt (Blakqori *et al.*, 2007; siehe Abbildung 3.3 B).

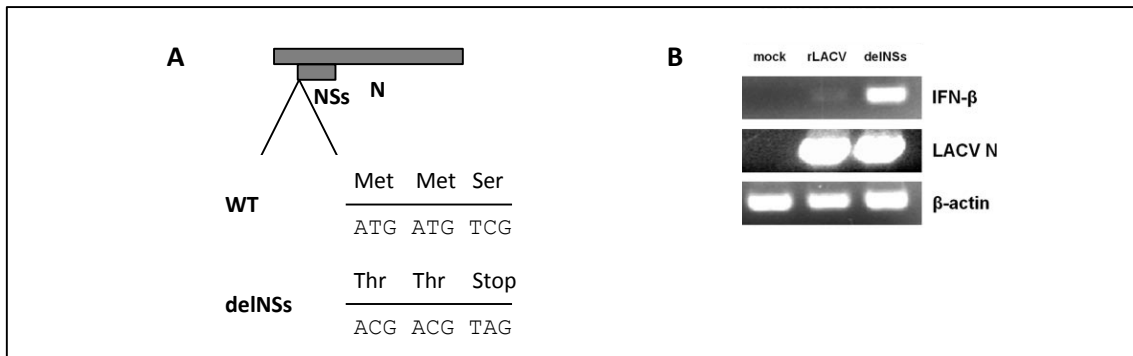


Abbildung 3.3: Einführte Mutationen im S-Segment und Interferon-Inhibition durch das LACV-NSs-Protein

A. Der Leserahmen für das LACV-NSs-Protein befindet sich innerhalb des Leserahmens für das N-Protein. Bei der delNSs-Mutante führen drei eingeführte Mutationen dazu, dass das LACV-NSs-Protein nicht exprimiert werden kann, das Gen für das N-Protein aber unbeschädigt bleibt. WT: LACV WT, delNSs: rLACVdelNSs. Modifiziert nach Blakqori & Weber, 2005. **B.** MEF (*mouse embryonic fibroblasts*)-Zellen von IFNAR-Knockout-Mäusen wurden entweder nicht infiziert (mock) oder mit rLACV oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 18 h p.i. (*post infection*) wurde RNA extrahiert und per RT-PCR mit Primern für IFN-β, LACV N und β-Actin analysiert. Abbildung aus Blakqori *et al.*, 2007.

Interessanterweise induziert LACV eine Translokation von IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) in den Nukleus und inhibiert somit nicht die IFN-Induktionssignalkette (Verbruggen *et al.*, 2011). Insofern unterscheidet sich das LACV-NSs-Protein von den meisten anderen IFN-Antagonisten. Es wurde jedoch gezeigt, dass LACV-NSs die Expression von Genen durch einen IFN-β- oder SV40-Promoter hemmt (Blakqori *et al.*, 2007). Die IFN-inhibierende Funktion ergibt sich aus der generellen Transkriptionshemmung des LACV-NSs-Proteins: die Expression von LACV-NSs führt dazu, dass die hyperphosphorylierte Form der RNA-Polymerase II (RNAPII, eine nähere Erläuterung findet sich in Kapitel 3.6) abgebaut wird (Verbruggen *et al.*, 2011; siehe Abbildung 3.4, das Signal für CTD-pSer2 und Ilo verschwindet). Im Gegensatz dazu hat das LACV-NSs-Protein keinen inhibierenden Einfluss auf die RNA-Polymerase I (RNAPI, Verbruggen *et al.*, 2011).

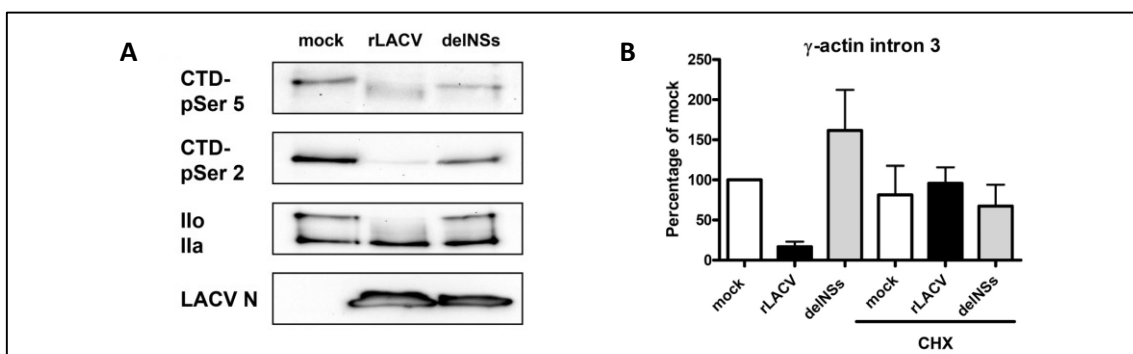


Abbildung 3.4: Abbau der RNA-Polymerase II durch das LACV-NSs-Protein

A. Vero-Zellen wurden entweder nicht infiziert (mock) oder mit rLACV oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 12 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (RNAPII), gegen die RNAPII im Gesamten und gegen LACV N analysiert. **B.** 293T-Zellen wurden entweder unbehandelt verwendet oder mit Cycloheximid (CHX), einem Translationsinhibitor, behandelt, dann mit rLACV oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert oder nicht infiziert (mock). 4 h p.i. wurde RNA extrahiert und mittels qRT-PCR mit Primern für γ-Actin Intron 3 und γ-Aktin (für Normalisierung) analysiert. Abbildungen aus Verbruggen *et al.*, 2011.

Neben der IFN-inhibierenden Funktion wird diskutiert, ob das LACV-NSs-Protein zusätzlich noch Apoptose in infizierten Zellen auslösen kann (Blakqori & Weber, 2005; Colon-Ramos *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2013). Das passt zu der ähnlichen Struktur des LACV-NSs-Proteins mit dem Reaper-Protein von *Drosophila melanogaster*, das ebenfalls Apoptose induziert (Colon-Ramos *et al.*, 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass das LACV-NSs-Protein die virale RNA-Synthese inhibiert (Blakqori *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2001).

Der LACV-NSs-induzierte Abbau von Rpb1 zeigt sehr starke Ähnlichkeiten zu der DNA-Schadensantwort (DNA damage response, DDR), in der Rpb1 ebenfalls durch das Proteasom abgebaut wird (Anindya *et al.*, 2007; Somesh *et al.*, 2007; Svejstrup, 2007). Allerdings können bestimmte DDR-Gene trotzdem noch weiter durch RNAPII transkribiert werden (Gomes *et al.*, 2006), zum Beispiel p53 und pak6 (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6*). Interessanterweise wird pak6 auch durch das LACV-NSs-Protein hochreguliert (Verbruggen *et al.*, 2011, siehe Abbildung 3.5 A). Durch eine Infektion mit LACV WT wird zudem ein weiterer Marker der DDR induziert; die Phosphorylierung des Histons H2AX (wird dann γ -H2AX genannt, siehe Abbildung 3.5 B).

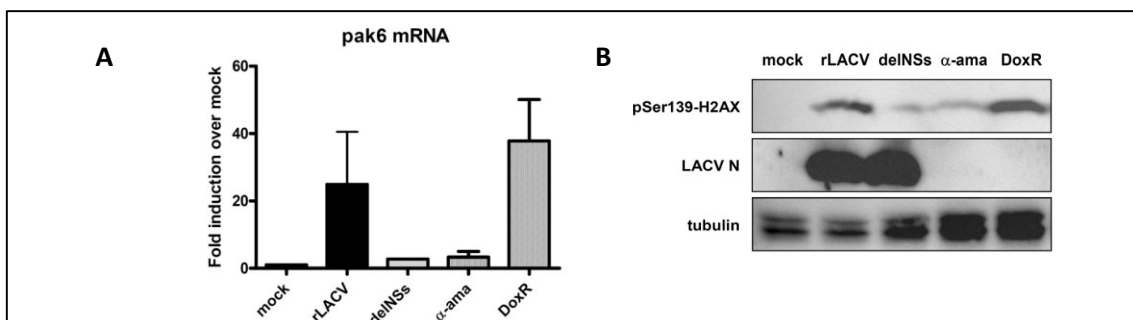


Abbildung 3.5: Merkmale der DNA-Schadensantwort, die auch durch LACV-NSs induziert werden

A. HeLa-Zellen wurden entweder nicht infiziert (mock), mit rLACV oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert oder mit α -Amanitin (α -ama) oder Doxorubicin (DoxR) behandelt. 8 h p.i. wurde RNA extrahiert und mittels qRT-PCR mit Primern für pak6 und γ -Aktin (für Normalisierung) analysiert. **B.** Vero-Zellen wurden wie in **A.** infiziert oder behandelt und 8 h p.i. lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und mit Antikörpern gegen pSer139-H2AX, LACV N und Tubulin analysiert. Abbildungen aus Verbruggen *et al.*, 2011.

In noch nicht veröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass LACV-NSs mit Elongin C interagiert (Paul Verbruggen und Andreas Schön). Elongin C ist vermutlich in den proteasomalen Abbau der RNAPII nach einem DNA-Schaden involviert (Ribar *et al.*, 2006). Andere Studien haben gezeigt, dass auch Nedd4 in diesen Abbau involviert ist (Anindya *et al.*, 2007). Studien von Harreman *et al.* haben ergeben, dass sowohl Nedd4 als auch eine Cullin3-Ubiquitin-E3-Ligase, die Elongin C enthält, für den Abbau der RNAPII nach einem DNA-Schaden verantwortlich sind (Harreman *et al.*, 2009).

Neben dem NSs-Protein von LACV übt auch das NSs-Protein von BUNV einen inhibierenden Effekt auf die IFN-Antwort aus (Bridgen *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2002). Es hat ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die Transkription durch die RNAPII, allerdings auf etwas andere Art und Weise. Es verhindert die Phosphorylierung des Serin2 (Ser2) in der C-terminalen Domäne (CTD) der RNAPII, wodurch die mRNA nicht weiter elongiert wird. Dies führt zu einer generellen Inhibition der Transkription (Thomas *et al.*, 2004). Das BUNV-NSs-Protein interagiert dafür mit Med8, einer Komponente des Mediator-Komplexes, der mit der CTD der RNAPII interagiert (Leonard *et al.*, 2006; Poss *et al.*, 2013).

3.6 Die zelluläre Transkription durch die RNA-Polymerase II

Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der eukaryotischen Zelle sind verantwortlich für die Synthese von verschiedenen RNA-Spezies. Hierbei ist die RNA-Polymerase I (RNAPI) verantwortlich für die Synthese von ribosomaler RNA (rRNA) im Nukleolus. Die RNA-Polymerase II (RNAPII) katalysiert die Bildung der *messenger RNA* (mRNA), außerdem auch die Bildung von snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) und snRNAs (*small nuclear RNAs*). Weiterhin werden durch die RNAPII siRNAs (*small interfering RNAs*) und miRNAs (*micro RNAs*) gebildet. Die RNA-Polymerase III (RNAPIII) ist für die Synthese von tRNAs (*transfer RNAs*), der 5S rRNA und einiger ncRNAs (*non-coding RNAs*) verantwortlich. Da gezeigt wurde, dass das LACV-NSs-Protein für den Abbau der RNAPII verantwortlich ist, soll hier näher auf dieses Enzym und seine Funktion eingegangen werden.

Der RNA-Polymerase II (RNAPII)-Holokomplex besteht aus insgesamt 12 Untereinheiten, die ihrer Migrationsgeschwindigkeit in einer SDS-PAGE (SDS: *sodium dodecyl sulfate*, Natriumsulfat; PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Rpb1 bis Rpb12 benannt werden (Young, 1991). Die größte Untereinheit ist hierbei die Rpb1-Untereinheit mit 220 kDa und ist, zusammen mit Rpb2, verantwortlich für die katalytische Aktivität (Young, 1991). Manche Untereinheiten, wie zum Beispiel Rpb5, 6, 10 und 12 werden zwischen allen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Zelle geteilt (Hahn, 2004; Thomas & Chiang, 2006). Die für diese Arbeit wichtigste Untereinheit ist die Rpb1-Untereinheit. Sie hat in ihrer C-terminalen Domäne (CTD) eine bestimmte Anzahl Wiederholungen der Konsensussequenz YS₂PTS₅PS₇ (die Serine werden hier mit Zahlen hervor-

gehoben, da sie im Phosphorylierungsverlauf der CTD eine besondere Rolle spielen, siehe unten). Im Falle der humanen RNAPII sind es 52 Wiederholungen der Konsensussequenz, im Falle der Hefe 26 bis 27. Die Aminosäuren dieser Sequenz können von verschiedenen Kinasen in den verschiedenen Stadien der Transkription phosphoryliert und von Phosphatasen dephosphoryliert werden. Der Transkriptionsstatus ist somit ablesbar am Phosphorylierungsstatus der CTD, der hier vereinfacht erläutert werden soll. Freie und neu an den Promoter des zu transkribierenden Gens rekrutierte RNAPII ist zuerst nicht phosphoryliert (hypophosphoryliert – „Ila“). Direkt nach der Rekrutierung wird Serin5 (Ser5) durch CDK7 (*cyclin-dependent kinase 7*), ein wichtiger Teil des TFIIF (Transkriptionsfaktor IIF), oder durch CDK8 phosphoryliert (Hirose & Ohkuma, 2007; Komarnitsky *et al.*, 2000; Napolitano *et al.*, 2014; Thomas & Chiang, 2006). Dieses Signal wird benötigt, um die Komponenten der Capping-Maschinerie zu der neu-synthetisierten prä-mRNA am 5'-Ende zu rekrutieren (Bird *et al.*, 2004). Nach den ersten Schritten der Transkription wird RNAPII durch negative Elongationsfaktoren angehalten, hauptsächlich um der Capping-Maschinerie genug Zeit zu geben, um die neu-synthetisierte prä-mRNA zu cappen. Dann wird der Transkriptionsfaktor pTEFb (positiver Transkriptionselongationsfaktor b) rekrutiert, um die Repression der Transkription zu beenden. pTEFb besteht aus der CDK9 (*cyclin-dependent kinase 9*) und dem Cyclin T1. Der Transkriptionsfaktor liegt in der Zelle gebunden an die ncRNA 7SK vor. Für die Phosphorylierung von Serin2 (Ser2) der Heptadwiederholungen der CTD dissoziiert der Faktor von der 7SK-RNA weg und CDK9 phosphoryliert Ser2 (somit ist die RNAPII hyperphosphoryliert – „Ilo“, siehe Abbildung 3.6). Dieses Signal führt dazu, dass die RNAPII anfängt, aktiv zu elongieren. CDK9 phosphoryliert außerdem NELF (*negative-acting elongation factor complex*) und DSIF (*DRB-sensitivity inducing complex*), um eine negative Regulation der Elongation durch diese beiden Faktoren zu verhindern (Bres *et al.*, 2008; Wada *et al.*, 1998). Das phosphorylierte Ser2 erhöht außerdem noch die Affinität der CTD zu Splicing- und Polyadenylierungsfaktoren, so dass die neu hergestellte mRNA modifiziert werden kann. Ist die RNAPII am Ende des zu transkribierenden Gens angekommen, so modifizieren Phosphatasen die CTD – hierbei ist Fcp1 (*F-cell production 1*) eine Phosphatase, die spezifisch Ser2 (in der Hefe) dephosphoryliert (Kong *et al.*, 2005). Ser5 wird in der Hefe von Ssu72 (*SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog*) und Rtr1 (*RNA polymerase II CTD phosphatase Rtr1*) dephosphoryliert (Mosley *et al.*, 2009; Reyes-Reyes & Hampsey, 2007). Nach der Dephosphorylierung kann RNAPII recycelt werden.

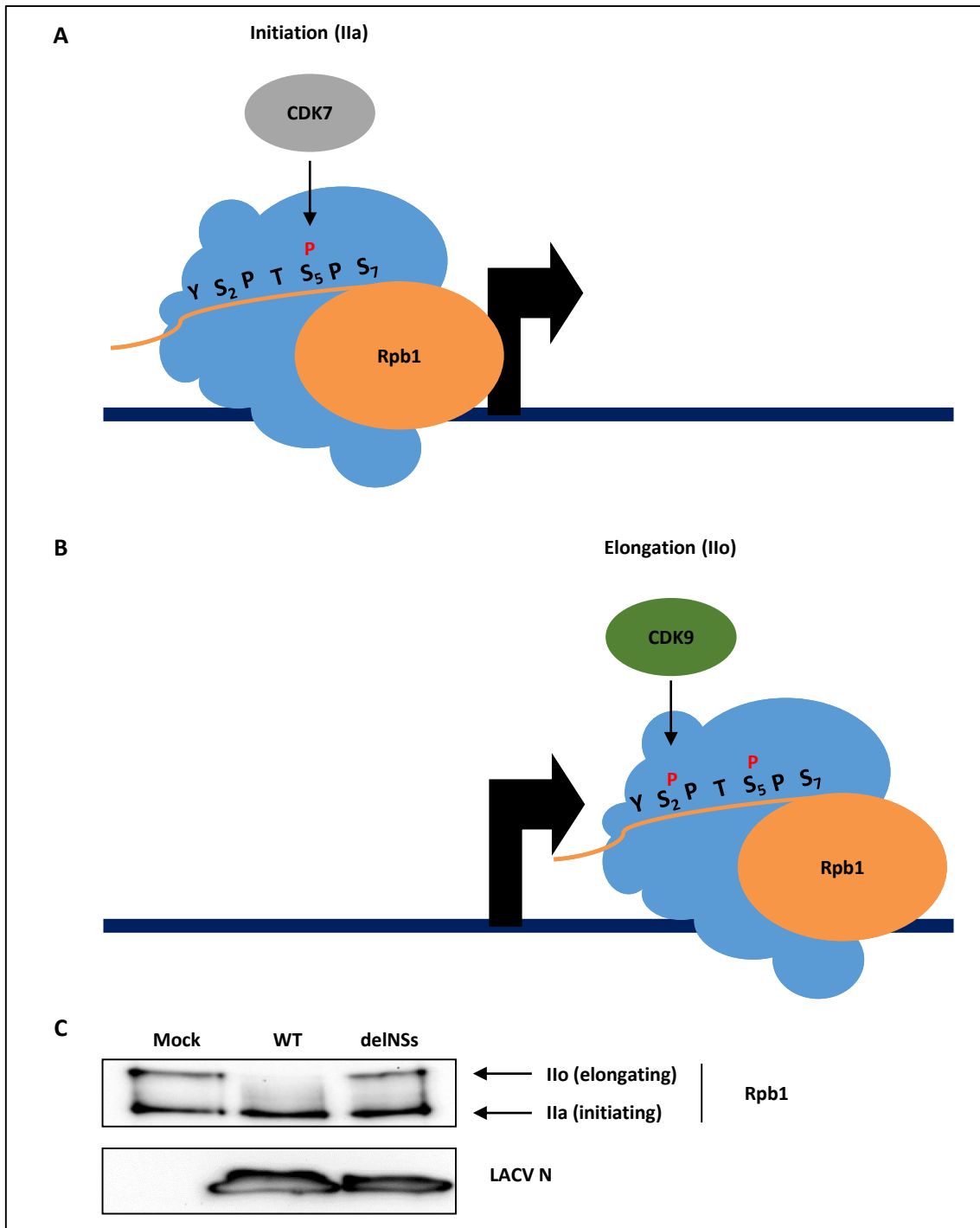


Abbildung 3.6: CTD-Zyklus der RNA-Polymerase II, Laufverhalten der Rpb1-Untereinheit in einem SDS-Gel und Einfluss des LACV-NSs-Proteins auf die Rpb1-Untereinheit

A. Nach der Rekrutierung an den Promoter wird Serin5 (Ser5/S₅) durch CDK7 (*cyclin-dependent kinase 7*) phosphoryliert. Damit ist die RNA-Polymerase II (RNAPII) in einem Initiationsstatus (Ila). **B.** Für die aktive Transkriptionselongation muss das Serin2 (Ser2/S₂) durch CDK9 (*cyclin-dependent kinase 9*), ein Teil des positiven Transkriptionselongationsfaktors pTEFb, phosphoryliert werden (Ilo). **C.** Laufverhalten der Rpb1-Untereinheit in einem SDS-Gel. Die obere Bande stellt die hyperphosphorylierte Form (Ser2 und Ser5) der C-terminalen Domäne (CTD) dar, die untere die einfach-phosphorylierte (Ser5). Während einer LACV WT-Infektion wird die Ilo-Bande abgebaut. Abbildung aus Verbruggen *et al.*, 2011.

3.6.1 Die DNA-Schadensantwort und die zelluläre Transkription

Es gibt viele verschiedene äußere Einflüsse, welche die RNAPII vorzeitig terminieren. Meistens führt ein DNA-Schaden dazu, dass die RNAPII nicht mehr weiter transkribiert, da dieser zuerst beseitigt werden muss, um sicherzustellen, dass keine geschädigte oder mutierte DNA abgelesen wird. Ein DNA-Schaden kann viele verschiedene Ursachen haben; beispielsweise können UV-Licht und verschiedene Agenzien wie Cisplatin oder Doxorubicin einen DNA-Schaden auslösen. Die RNAPII kann aber auch angehalten werden, wenn beispielsweise der pTEFb-Komplex inhibiert wird. Das Schicksal der angehaltenen RNAPII ist abhängig von der Natur des Schadens, wobei es bei einem nicht zu reparierenden DNA-Schaden zum Abbau der RNAPII kommt. Hierbei gibt es mehrere Wege des Abbaus (Anindya *et al.*, 2007; Harreman *et al.*, 2009; Somesh *et al.*, 2007; Yasukawa *et al.*, 2008) und der Weg ist wahrscheinlich abhängig vom Phosphorylierungsstatus und von der Position der RNAPII auf dem Gen. Der Weg erfolgt immer über das Ubiquitin-Proteasom-System, allerdings ist der Beginn unterschiedlich. Eine initiierende RNAPII, die durch einen durch UV-Bestrahlung herbeigeführten DNA-Schaden aufgehalten wird, wird durch einen RING (*really interesting new gene*)-E3-Ligase-Komplex, in dem Elongin A ein wichtiger Bestandteil ist, dem Abbau zugeführt. Die elongierende RNAPII hingegen wird durch die HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*)-E3-Ligase Nedd4 dem Abbau zugeführt. Auch DNA-schädigende Agenzien können zum Abbau der RNAPII führen. Hierbei kommt es zum Beispiel durch das von Pilzen hergestellte Toxin α -Amanitin zum sehr schnellen Abbau der RNAPII. Der Grund des Abbaus ist allerdings kein DNA-Schaden, sondern die Interaktion des Toxins mit der RNAPII. Die Interaktion führt dazu, dass die Translokation von RNA und DNA nicht stattfinden kann und somit die Synthese der neuen mRNA gestört wird. Im Gegensatz dazu bindet Actinomycin D, ein Antibiotikum aus dem Bakterium *Streptomyces*, die DNA am Transkriptions-Initiationskomplex und verhindert somit den Eintritt in die Elongationsphase. Das führt allerdings nicht zum Abbau der RNAPII. Doxorubicin ist ein DNA-Interkalator, der durch die Interkalation das Enzym Topoisomerase II daran hindert, die DNA für die Replikation aufzuwinden. Es verursacht eine starke Induktion der Apoptose und einen generellen sogenannten „Wirtszell-Shut-off“, führt aber nicht zum Abbau der RNAPII. Diese drei Agenzien wurden in den im Kapitel 7 beschriebenen Experimenten teilweise als Kontrollen benutzt.

3.7 Der Ubiquitin-Proteasom-abhängige Abbau von Proteinen

3.7.1 Ubiquitin, Ubiquitinylierungen und das Proteasom

Ubiquitin ist ein kleines, hochkonserviertes Protein, bestehend aus 76 Aminosäuren und wird als posttranslationale Modifikation an Proteine angehängen. Dieses Anhängen erfolgt in der Regel via des C-terminalen Glycins an Lysinreste. Ubiquitin hat insgesamt sieben Lysine, wodurch die Bildung von Ubiquitinketten möglich ist; die Verlinkung über die verschiedenen Lysine ist ausschlaggebend für das Schicksal des modifizierten Proteins. So signalisieren zum Beispiel Ubiquitinketten, die über Lysin48 (K48) verlinkt sind, den Abbau des modifizierten Proteins (Finley, 2009; Komander & Rape, 2012). Der Abbau erfolgt über das Proteasom, wenn mindestens vier Ubiquitine verkettet werden (Thrower *et al.*, 2000). Ein Abbau kann aber auch über den lysosomalen Weg erfolgen; hierfür ist eine Mono-Ubiquitinylierung oder eine Ubiquitinkette, die über Lysin63 (K63) verlinkt ist, erforderlich. Die Ubiquitinketten, die gebildet werden, sind von dem Typ der Poly-Ubiquitinylierung (Verlinkung von Ubiquitinketten an einen Lysinrest). Die Modifikation mit Ubiquitin ist außerdem verantwortlich für Protein-Protein-Interaktionen, die Aktivierung von verschiedenen Proteinfunktionen oder die Relokalisation von Proteinen in andere Zellkompartimente (Finley, 2009; Komander & Rape, 2012). Hierbei treten Mono-Ubiquitinylierungen (Verlinkung eines Ubiquitins an einen Lysinrest) und Multi-Ubiquitinylierungen auf (siehe Abbildung 3.7). Bei der Ubiquitinylierung erfolgt eine Kaskade aus insgesamt drei Enzymen. Zuerst wird Ubiquitin an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, das E1-Protein, konjugiert. Von diesen E1-Proteinen gibt es insgesamt nur zwei im Menschen. Ubiquitin wird dann zum Ubiquitin-konjugierenden Enzym, dem E2-Enzym, transferiert. Hiervon gibt es circa 30 verschiedene Proteine im Menschen. Danach wird das Substrat von einer Ubiquitin-Ligase, dem E3-Enzym, erkannt und von dem E2-Enzym auf das Substrat übertragen (siehe Abbildung 3.7). Von den E3-Enzymen gibt es mehrere hundert im Menschen, da tausende verschiedene Proteine ubiquitinyliert werden (Kim *et al.*, 2011). Die E3-Ligasen fallen in zwei Klassen: Die RING- und die HECT-Ligasen. Die meisten humanen Ubiquitin-Ligasen gehören zu der RING-Familie und 28 Mitglieder gehören zu der HECT-Familie (Yang & Kumar, 2010). Für diese Arbeit ist die HECT-Ligase Nedd4 von besonderer Bedeutung und wird in Kapitel 3.7.2 näher beschrieben.

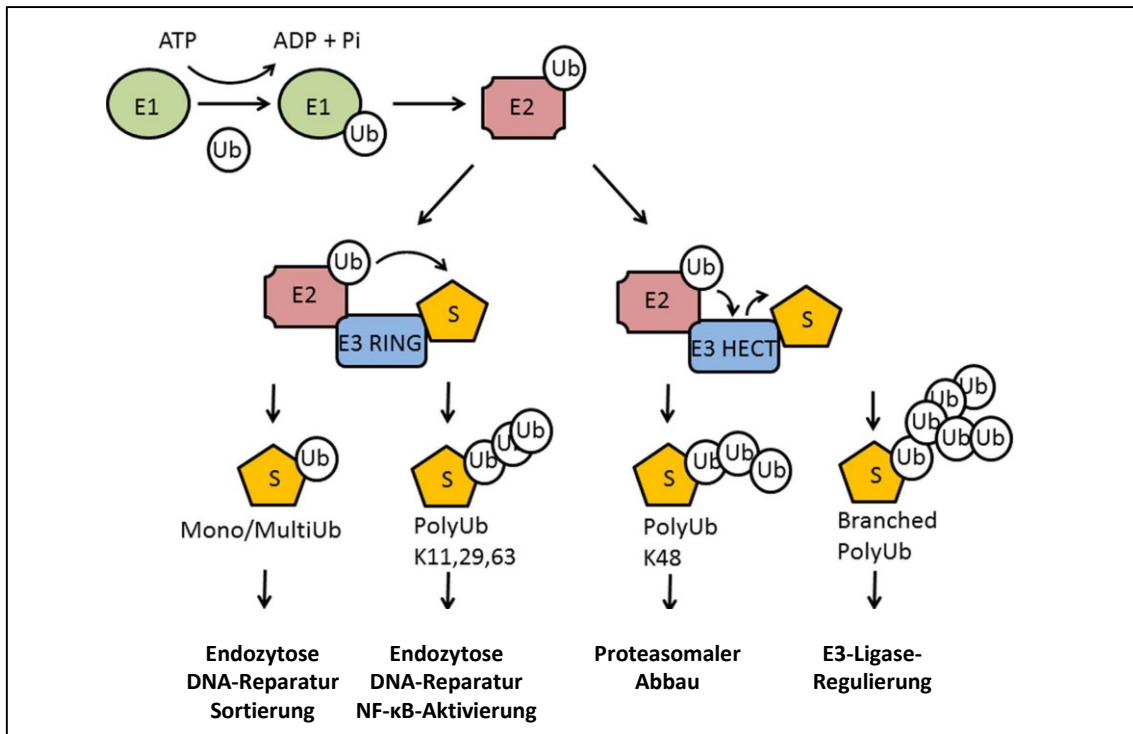


Abbildung 3.7: Ubiquitin-Konjugationsweg

Freies Ubiquitin (Ub) wird durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert. Dabei wird ATP (Adenosintriphosphat) verbraucht. Das Ubiquitin wird dann auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) transferiert. E2 bindet an eine Ubiquitin-Ligase (E3), die die Polymerisierung von Ubiquitin an das Substrat (S) vermittelt. Hierbei erfolgt im Falle von RING (*really interesting new gene*)-Ligasen eine direkte Ubiquitin-Konjugation von E2 auf das Substrat. Im Falle der HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*)-Ligasen wird Ubiquitin zuerst auf die Ligase und dann auf das Substrat übertragen. Die verschiedenartige Ubiquitylierung an das Substrat bestimmt, was mit dem Substrat geschieht. *Branched*: verzweigt. Modifiziert nach Perrett *et al.*, 2011.

Das 26S-Proteasom ist ein Multiprotein-Komplex, der aus einer katalytisch aktiven 20S-Untereinheit besteht, an deren Enden sich jeweils eine regulatorische 19S-Untereinheit befindet (Forster *et al.*, 2013). Es baut sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern Proteine ab, die vorher ubiquityliert wurden, und ist somit ein wichtiger Bestandteil für den Proteinhaushalt der Zelle (Gardner *et al.*, 2005). Durch die Proteolyse von regulatorischen Proteinen ist das Proteasom involviert in Prozesse wie Signaltransduktion, Antigen-Präsentation, Apoptose, DNA-Reparatur und Transkription.

3.7.2 Die Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4

Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) ist eine Ubiquitin-E3-Ligase, die der HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*)-Ligasen-Familie angehört. HECT-Ligasen erhalten ein Ubiquitin von einem E2-Enzym und transferieren es dann auf

ein Substrat (siehe Abbildung 3.8). Zu der Nedd4-Gruppe gehören neben Nedd4 noch Nedd4-2 (Nedd4L), WWP-Itchy, Smurf1, Smurf2, WWP1, WWP2, NedL1 und NedL2 (Grau-Bove *et al.*, 2013; Yang & Kumar, 2010). In der Hefe ist das Homolog von Nedd4 die Rsp5-Ligase.

Nedd4 ist circa 120 kDa groß und besteht aus einer Calcium/Lipid-bindenden Domäne (C2), mehreren WW-Domänen und einer C-terminalen HECT-Domäne (Anan *et al.*, 1998). Die Bindung an Calcium ist wichtig für die Aktivierung von Nedd4, da sie die Auto-Inhibition aufhebt (Wang *et al.*, 2010). Außerdem ist diese Domäne für die Bindung an Phospholipide zuständig, wodurch Nedd4 an Membranen binden kann (Rotin & Kumar, 2009). Weiterhin wurde erst kürzlich gezeigt, dass eine Phosphorylierung von Tyrosinresten in der C2- und in der HECT-Domäne für die Aktivierung von Nedd4 wichtig ist (Persaud *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu scheint eine Sumoylierung die Ligase-Aktivität zu inhibieren (Novoselova *et al.*, 2013). Die WW-Domänen sind für die Interaktion mit den Substraten und anderen regulatorischen Proteinen verantwortlich und können PPxY- oder LSPY-Motive binden (W: Tryptophan, P: Prolin, x: beliebige Aminosäure, Y: Tyrosin, L: Lysin, S: Serin). Die HECT-Domäne besteht aus 350 Aminosäuren und wurde erstmals im Protein E6AP (*human papilloma virus E6 associated protein*) beschrieben.

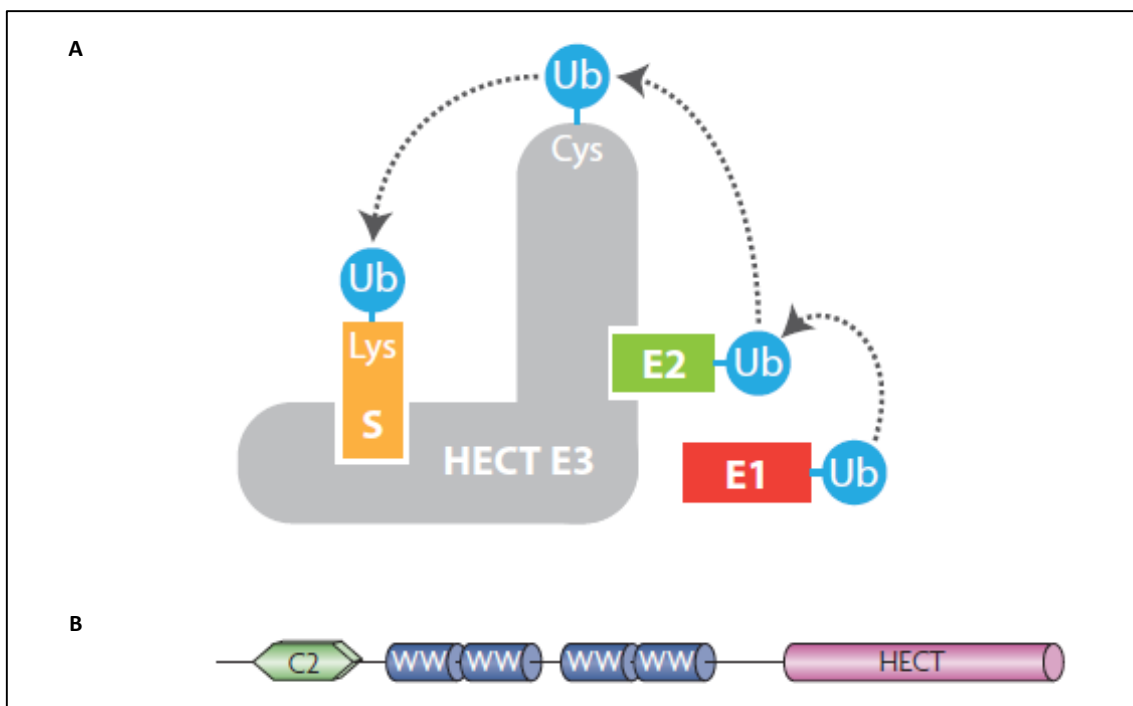


Abbildung 3.8: Ubiquitin-Ligation an ein Proteinsubstrat durch eine HECT-Ubiquitin-Ligase und Struktur von Nedd4
A. Die Ligation erfolgt von einem E1-Enzym über das E2-Enzym auf die HECT-Ubiquitin-E3-Ligase. Diese ligiert Ubiquitin (Ub) dann über eine Thioesterbrücke an einen Lysinrest des Proteinsubstrats (S). Hierbei ist ein Cysteinrest der HECT-Ubiquitin-E3-Ligase involviert. Cys: Cystein, Lys: Lysin. Abbildung aus Grau-Bove *et al.*, 2013. **B.** Struktur der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4. C2: Calcium/Lipid-bindende Domäne, WW: Protein-Interaktionsdomäne, HECT: Ligase-Domäne. Abbildung aus Rotin & Kumar, 2009.

Nedd4 ist in vielen verschiedenen zellulären Prozessen involviert. Das erste beschriebene Substrat von Nedd4 war der Natriumkanal ENaC (Yang & Kumar, 2010). Weiterhin ist Nedd4 beispielsweise involviert in die Regulation von Rezeptoren von Wachstumsfaktoren oder in die Regulation von T-Zell-Funktionen (Yang & Kumar, 2010). MEF-Zellen von Nedd4-Knockout-Mäusen zeigen verminderte mitogene Aktivität, was darauf schließen lässt, dass Nedd4 ein positiver Regulator der Zellproliferation ist (Cao *et al.*, 2008). Des Weiteren reguliert Nedd4 das Abknospen viraler Partikel, zum Beispiel vom humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder vom Ebola-Virus (Harty *et al.*, 2000; Sette *et al.*, 2010; Strack *et al.*, 2000; Timmins *et al.*, 2003; Yasuda *et al.*, 2003). Auch das Herpes-Simplex-Virus (HSV) wird durch Nedd4 reguliert (Ushijima *et al.*, 2009; Ushijima *et al.*, 2008). Weiterhin ist Nedd4 in die Regulation der Transkription involviert. So ubiquitinyliert in *Saccharomyces cerevisiae* das Nedd4-Homolog Rsp5 die Rpb1-Untereinheit von RNAPII (Beaudenon *et al.*, 1999; Harreman *et al.*, 2009; Huibregtse *et al.*, 1997; Somesh *et al.*, 2007). Hierzu interagieren die WW-Domänen von Rsp5 mit der CTD von RNAPII (Chang *et al.*, 2000). Auch für das humane Nedd4 wurde schon beschrieben, dass es den Abbau der RNAPII reguliert (Anindya *et al.*, 2007; Harreman *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013). Hierbei ist Nedd4 vor allem in den Abbau der RNAPII nach einem DNA-Schaden involviert (siehe Kapitel 3.6.1).

4 Ziele dieser Arbeit

Das NSs (*non-structural protein encoded on the S segment*)-Protein des La Crosse-Virus (LACV) ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass das LACV-NSs-Protein die antivirale Wirtsabwehr inhibiert, indem es die Rpb1-Untereinheit der RNA-Polymerase II (RNAPII) dem proteasomalen Abbau zuführt (siehe Kapitel 3.5). Hierbei zielt der proteasomale Abbau auf die hyperphosphorylierte, aktiv transkribierende RNAPII. Ein solcher Abbau zeigt Parallelen zu der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR), in der ebenfalls die hyperphosphorylierte Form der RNAPII abgebaut wird, wenn der DNA-Schaden nicht repariert werden kann (siehe Kapitel 3.6.1). Die vermehrte Expression der Kinase pak6 (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6*) während einer LACV-Infektion stellt eine weitere Parallele zu der DNA-Schadensantwort dar, in der pak6 ebenfalls hochreguliert wird, ebenso wie die Phosphorylierung des Histons H2AX (siehe Kapitel 3.5).

Für den Abbau der RNAPII nach Eintreten eines DNA-Schadens wurde ein Weg postuliert, in dem die beiden Proteine Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) und Elongin C eine wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel 3.6.1). Nedd4 ist in dieser Kaskade die initiierende Ubiquitin-E3-Ligase, die Rpb1 mono-ubiquitinyliert. Diese wird durch einen Elongin C-Cullin3-Komplex erkannt, der für die Poly-Ubiquitinylierung von Rpb1 verantwortlich ist. Elongin C wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten als zellulärer Interaktor des LACV-NSs-Proteins identifiziert (siehe Kapitel 3.5).

Ziele dieser Arbeit waren es, weitere eventuell vorhandene Parallelen zu der DNA-Schadensantwort zu finden. Hierzu sollte zunächst die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems untersucht werden. Durch sogenannte „Ubiquitin-Pulldowns“ sollte festgestellt werden, ob in LACV-infizierten Zellen eine generelle Ubiquitinylierung induziert wird und in welcher Weise hierzu das Ubiquitin verlinkt wird. Weiterhin sollte mit Hilfe dieser Methode untersucht werden, ob Rpb1 ubiquitinyliert wird. Ferner sollte die Beteiligung der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 am Abbau der RNAPII durch das LACV-NSs-Protein mit Hilfe von siRNA-Experimenten und Immunfluoreszenzen analysiert werden.

Darüber hinaus sollte die generelle Wirtszellantwort auf eine LACV-Infektion, unabhängig von der Expression des NSs-Proteins, mit Hilfe eines cDNA-Microarrays erforscht werden.

5 Material

5.1 Viren

| Bezeichnung | Familie (Genus) | Beschreibung |
|-------------|---------------------------------------|--|
| AdV | <i>Adenoviridae</i> (Mastadenovirus) | Wildtyp-Isolat |
| LACV WT | <i>Bunyaviridae</i> (Orthobunyavirus) | Wildtyp-Isolat |
| rLACVdelNSs | <i>Bunyaviridae</i> (Orthobunyavirus) | Rekombinantes LACV, das aufgrund von mutierten Startcodons und eines eingefügten Stoppcodons innerhalb des NSs-Gens kein NSs-Protein exprimieren kann (Blakqori & Weber, 2005) |
| VSV | <i>Rhabdoviridae</i> (Vesiculovirus) | Wildtyp-Isolat |

5.2 Zellkultur von eukaryotischen Zellen

5.2.1 Eukaryotische Zellen

| Bezeichnung | Organismus | Zelltyp |
|---|---|-------------------------------|
| A549 | <i>Homo sapiens</i> (Mensch) | Lungenadenokarzinomzellen |
| BHK (<i>baby hamster kidney</i>) | <i>Mesocricetus auratus</i> (Syrischer Goldhamster) | Fibroblasten |
| CV1 | <i>Chlorocebus aethiops</i> (Äthiopische Grünmeerkatze) | Fibroblasten |
| HeLa (Henrietta Lacks) | <i>Homo sapiens</i> (Mensch) | Zervikale Adenokarzinomzellen |
| Huh7 | <i>Homo sapiens</i> (Mensch) | Hepatokarzinomzellen |
| MEF (<i>mouse embryonic fibroblast</i>) | <i>Mus musculus</i> (Maus) | Embryonale Fibroblasten |
| U2OS-Ubiquitin-Zellen (Xu <i>et al.</i> , 2009) | <i>Homo sapiens</i> (Mensch) | Osteosarkomzellen |
| VeroE6 | <i>Chlorocebus aethiops</i> (Äthiopische Grünmeerkatze) | Nierenepithelzellen |

5.2.2 Reagenzien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|-------------------|
| 0,05 % Trypsin-EDTA (1x) | Life Technologies |
| Agar, Noble | Becton Dickinson |
| Avicel (3 %, gelöst in H ₂ O) | FMC BioPolymer |
| DEAE-Dextran-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich |
| DMEM Media Powder (für Herstellung von 2x DMEM) | Life Technologies |
| DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine | Life Technologies |
| Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS) | Life Technologies |
| Geneticin, 50 mg/ml | Life Technologies |
| L-Glutamin, 200 mM | Life Technologies |
| Lipofectamine RNAiMAX | Life Technologies |
| Nanofectin Kit | PAA |
| Opti-MEM, Reduced Serum Media | Life Technologies |
| Penicillin-Streptomycin, 5000 U/ml | Life Technologies |
| Plasmocin | InvivoGen |
| Puromycin-Dihydrochlorid | Sigma-Aldrich |
| TransIT-LT1 | Mirus Bio LLC |
| Tetracyclin | Sigma-Aldrich |
| Trypanblau-Lösung (4x10 ⁻⁴ %, in H ₂ O steril filtriert) | Merck |

5.2.3 Medien und Lösungen

| Bezeichnung/ Inhalt | | Konzentration/ Volumen/ Gewicht |
|---|------------------------------------|---------------------------------|
| Zellkulturmedium normal/ für HeLa-Zellen | | |
| DMEM versetzt mit: | FCS | 10 %/ 5 % |
| | L-Glutamin, 200 mM | 1 %/ 2 % |
| | Penicillin-Streptomycin, 5000 U/ml | 1 %/ 1 % |
| Infektionsmedium | | |
| Opti-MEM versetzt mit: | DEAE-Dextran-Hydrochlorid | 0,002 % |
| Avicelmedium | | |
| 2x DMEM versetzt mit: | Avicel (3 %) für LACV WT | 1,5 % |
| | Avicel (3 %) für rLACVdelNSs | 0,3 % |
| | DEAE-Dextran-Hydrochlorid | 0,002 % |
| | FCS | 10 % |
| | L-Glutamin, 200 mM | 1 % |
| TCA (<i>trichloroacetic acid</i>)-Lösung | | |
| H ₂ O versetzt mit: | TCA | 20 % |
| Kristallviolett-Lösung | | |
| 730 ml H ₂ O versetzt mit: | Formaldehyd | 230 ml |
| | Kristallviolett | 1 g |

5.3 Zellkultur von prokaryotischen Zellen

5.3.1 Prokaryotische Zellen

| Bezeichnung | Organismus | Genotyp |
|-------------|-------------------------------------|---|
| DH10B | <i>Escherichia coli</i> (Bakterium) | F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139 deoR</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> λ - |

5.3.2 Medien und Lösungen

| Bezeichnung/ Inhalt | | Gewicht/ Konzentration |
|--|--|------------------------|
| LB-Medium | | |
| H ₂ O versetzt mit: (ad 5 l) | NaCl | 50 g |
| | Hefeextrakt | 25 g |
| | Pepton | 50 g |
| LB-Agar | | |
| LB-Medium versetzt mit: | Bacto-Agar | 1,5 % |
| TBF-1-Lösung | | |
| H ₂ O versetzt mit: | CaCl ₂ | 10 mM |
| | Glycerol | 15 % |
| | Kaliumacetat | 30 mM |
| | KCl | 100 mM |
| | MnCl ₂ | 50 mM |
| TBF-2-Lösung | | |
| H ₂ O versetzt mit: | CaCl ₂ | 75 mM |
| | Glycerol | 15 % |
| | KCl | 10 mM |
| | MOPS (3-(<i>N</i> -morpho- <i>lino</i>)propanesulfonic acid) | 10 mM |

5.4 Antikörper

5.4.1 Antikörper für Western-Blot

| Protein | Spezies | Klonalität | Hersteller | Verdünnung | #* |
|-------------------------------|-----------|------------|------------------------------|------------|-----|
| Primärantikörper | | | | | |
| HA | Kaninchen | poly | Abcam | 1:3200 | 11 |
| K48-Ubiquitin (clone Apu2) | Kaninchen | mono | Merck | 1:1000 | 174 |
| K63-Ubiquitin (clone Apu3) | Kaninchen | mono | Merck | 1:1000 | 172 |
| LACV N | Kaninchen | poly | Georg Kochs, Freiburg | 1:5000 | 25 |
| LACV N | Ratte | poly | Stephen Cusack, Grenoble | 1:5000 | 133 |
| Nedd4 | Kaninchen | poly | Abcam | 1:1000 | 170 |
| p-Rpb1 (Ser2) | Ratte | poly | Dirk Eick, München | 1:500 | 118 |
| p-Rpb1 (Ser5) | Ratte | poly | Dirk Eick, München | 1:500 | 119 |
| Rpb1 | Kaninchen | poly | Santa Cruz | 1:500 | 69 |
| Ubiquitin (P4D1) | Maus | mono | Cell Signaling | 1:1000 | 120 |
| β-Aktin | Maus | mono | Cell Signaling | 1:1000 | 53 |
| Sekundärantikörper | | | | | |
| anti-Kaninchen, Peroxidase | Ziege | poly | Thermo Fisher | 1:20.000 | 4 |
| anti-Maus, Peroxidase | Ziege | poly | Thermo Fisher | 1:20.000 | 3 |
| anti-Ratte, Peroxidase | Esel | poly | Jackson Immuno Re- search | 1:20.000 | 100 |

5.4.2 Antikörper für Immunfluoreszenz

| Protein | Spezies | Klonalität | Hersteller | Verdünnung | #* |
|-------------------------|---------|------------|---------------------------------|------------|----|
| Primärantikörper | | | | | |
| Flag M2 | Maus | mono | Stratagene | 1:500 | 38 |
| LACV Gc | Maus | mono | Francisco González- Scarano, | 1:400 | 15 |

* Nummer in der Laborsammlung

| | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------|-----------------------------|--------|-----|
| | | | San Antonio | | |
| LACV L | Kaninchen | poly | Stephen Cusack, Grenoble | 1:500 | 1 |
| LACV N | Ratte | poly | Stephen Cusack, Grenoble | 1:500 | 133 |
| Nedd4 | Kaninchen | poly | Abcam | 1:1000 | 170 |
| Sekundärantikörper | | | | | |
| anti-Maus, Alexa Fluor488 | Esel | poly | Life Technologies | 1:200 | 6 |
| anti-Maus, Alexa Fluor555 | Esel | poly | Life Technologies | 1:200 | 7 |
| anti-Kaninchen, Alexa Fluor488 | Esel | poly | Life Technologies | 1:200 | 77 |
| anti-Kaninchen, Alexa Fluor555 | Esel | poly | Life Technologies | 1:200 | 8 |
| anti-Kaninchen, Alexa Fluor647 | Esel | poly | Life Technologies | 1:200 | 214 |
| anti-Ratte, Alexa Fluor488 | Ziege | poly | Life Technologies | 1:200 | 143 |

5.5 Oligonukleotide

5.5.1 Primer

| Genname (Bezeichnung) | Verwendung, Sequenz (bei nicht kommerziell erhältlichen Primern) oder Produktnummer (bei kommerziell erhältlichen Primern) | Hersteller | #* |
|--|--|------------|-----|
| Primer für humane Zielgene | | | |
| exogenes Ubiquitin (IRES_exo_Ubi_fw) | für quantitative Realtime-PCR (Xu <i>et al.</i> , 2009), AGCTGAATTCCTCCCCCCCCCTAAC | Biomers | 448 |
| exogenes Ubiquitin (IRES_exo_Ubi_rev) | für quantitative Realtime-PCR (Xu <i>et al.</i> , 2009), GACTGCGGCCGCTTATCATCGTGTTCATCAAGGAA | Biomers | 449 |
| GAPDH (Hs_GAPDH_2_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT01192646 | Qiagen | 37 |
| IFIT1/ISG56 (Hs_IFIT1_1_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT00201012 | Qiagen | 19 |
| IFN- β (Hs_IFNB1_1_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT00203763 | Qiagen | 18 |

* Nummer in der Laborsammlung

| | | | |
|---|---|---------|-----|
| Nedd4 (Hs_Nedd4_1_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT00001036 | Qiagen | 43 |
| RPS27A (RPS27A_fw) | für quantitative Realtime-PCR (Xu <i>et al.</i> , 2009), CTTTTCGATCCGCCATCTGC | Biomers | 446 |
| RPS27A (RPS27A_rev) | für quantitative Realtime-PCR (Xu <i>et al.</i> , 2009), AGCTGGATCCTTACTTGTCTTCTGGTTTGTGAAACA | Biomers | 447 |
| Ubiquitin (Hs_UBB_2_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT02453101 | Qiagen | 39 |
| Ubiquitin B (UBB_fw) | für quantitative Realtime-PCR (Xu <i>et al.</i> , 2009), CCTGTGGGTGGACGTGGTTGGTGA | Biomers | 442 |
| Ubiquitin B (UBB_rev) | für quantitative Realtime-PCR (Xu <i>et al.</i> , 2009), AGTGAGGGTCTTCACAAAGATCTGGGCAGCTCTCA- GACGCAGGACCAG | Biomers | 443 |
| γ -Aktin-Intron (γ -Aktin-Intron_fw) | für quantitative Realtime-PCR (Cheng & Sharp, 2003), GCTGTCCAGGCTCTGTCC | Sigma | 283 |
| γ -Aktin-Intron (γ -Aktin-Intron_rev) | für quantitative Realtime-PCR (Cheng & Sharp, 2003), ATGCTCACACGCCACAACATGC | Sigma | 284 |
| Primer für murine Zielgene | | | |
| CXCL10/IP-10 (Mm_Cxcl10_1_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT00093436 | Qiagen | 5 |
| GAPDH (Mm_Gapdh_3_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT01658692 | Qiagen | 8 |
| IFIT1/ISG56 (Mm_Ifit1_1_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT01161286 | Qiagen | 6 |
| IFN- β (Mm_Ifnb1_1_SG) | für quantitative Realtime-PCR, QT00249662 | Qiagen | 7 |
| Primer für virale Zielgene | | | |
| LACV N (LACV_N_fw) | für quantitative Realtime-PCR (Verbruggen <i>et al.</i> , 2011), GGGTATATGGACTTCTGTG | Biomers | 409 |
| LACV N (LACV_N_rev) | für quantitative Realtime-PCR (Verbruggen <i>et al.</i> , 2011), GCCTTCCTCTCTGGCTTA | Biomers | 410 |
| LACV N (LACV_N_ORF_fw) | für diagnostische PCR, GACAGCTAGCATGTCTG GATTTGGTGTTTT | Sigma | 148 |
| LACV N (LACV_N_ORF_rev) | für diagnostische PCR, GACAGCGGCCGCTTAT GGAAGCCTGATGCCAAATTTCTG | Sigma | 149 |
| Primer für Mycoplasmen-Diagnose | | | |
| GPO3 | für diagnostische PCR, GGGAGCAAACACGATAGATACCCT | Biomers | 437 |
| MGSO | für diagnostische PCR, TGCACCATCTGTCACTCTGTAACTC | Biomers | 438 |

5.5.2 siRNA

| Genname (Bezeichnung) | Produktnummer | Hersteller | #* |
|--|---------------|-------------------|---------|
| 7SK-RNA (FlexiTube GeneSolution GS125050 for RN7SK) | GS125050 | Qiagen | 82 - 85 |
| All Star negative control | SI04381048 | Qiagen | 16 |
| Nedd4 (Stealth siRNA Nedd4) | 1299001 | Life Technologies | 20 - 22 |

5.6 DNA-Plasmide

| Bezeichnung | Resistenz | Beschreibung | #* |
|--------------------|------------|---|-----|
| pCEP-NEDD4_inaktiv | Ampicillin | Kodiert für eine Ligase-inaktive Mutante von Nedd4, in der das verantwortliche Cystein zu Alanin mutiert wurde (Shcherbik <i>et al.</i> , 2002) | 238 |
| pCEP-NEDD4_WT | Ampicillin | Kodiert für Nedd4 (Shcherbik <i>et al.</i> , 2002) | 237 |
| pEGFP-N1 | Kanamycin | Kodiert für eGFP; war kommerziell über Clontech erhältlich | 46 |

5.7 Enzyme und Längenstandards

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---------------|
| Enzyme | |
| DNaseI, RNase-frei | Fermentas |
| EcoRI | NEB |
| JumpStart Taq DNA-Polymerase | Sigma-Aldrich |
| Längenstandards | |
| ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10 - 230 kDa) | NEB |
| O'GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder | Fermentas |

* Nummer in der Laborsammlung

5.8 Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|----------------|
| E.Z.N.A. Plasmid Midi Kit | Omega Bio-Tek |
| NucleoBond PC100 | Macherey-Nagel |
| OneStep RT-PCR Kit | Qiagen |
| QIAamp Viral RNA Mini Kit | Qiagen |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen |
| QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit | Qiagen |
| RNase-Free DNase Set | Qiagen |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate | Thermo Fisher |
| SuperSignal West Pico Maximum Sensitivity Substrate | Thermo Fisher |

5.9 Puffer und Lösungen

| Bezeichnung/ Inhalt | Inhalt | Konzentration |
|---|--------------------------|---------------|
| Puffer für DNA-Analysen | | |
| 50x TAE, pH 8,0 | EDTA | 50 mM |
| | Essigsäure | 1 M |
| | Tris | 2 M |
| TE-Puffer, pH 8,0 | EDTA | 1 mM |
| | Tris | 10 mM |
| Lysepuffer | | |
| RIPA-Puffer, pH 7,5 | NaCl | 150 mM |
| | NP-40 | 1 % |
| | Tris-HCl | 50 mM |
| Probenpuffer | | |
| 1x SDS-Probenpuffer aus 4x SDS-Probenpuffer | 4x | 25 % |
| | T-Per | 75 % |
| 1x SDS-Probenpuffer aus 5x SDS-Probenpuffer | 5x | 20 % |
| | T-Per | 80 % |
| 4x SDS-Probenpuffer, pH 6,8 | β -Mercaptoethanol | 20 % |
| | Bromphenolblau | 0,29 % |
| | Glycerol | 28,6 % |
| | SDS | 10 % |
| | 0,5 M Tris-HCl | 28,6 % |
| 5x SDS-Probenpuffer, pH 6,8 | β -Mercaptoethanol | 25 % |

| | | |
|---|----------------------------------|--------|
| | Bromphenolblau | 0,5 % |
| | Glycerol | 50 % |
| | SDS | 10 % |
| | Tris-HCl | 250 mM |
| Puffer für SDS-PAGE | | |
| 10 % APS (in H ₂ O) | APS | 10 % |
| 10 % SDS (in H ₂ O) | SDS | 10 % |
| Sammelgelpuffer, pH 6,8 | Tris-HCl | 0,5 M |
| SDS-Laufpuffer | Glycin | 384 mM |
| | SDS | 0,1 % |
| | Tris | 50 mM |
| Trenngelpuffer, pH 8,8 | Tris-HCl | 1,5 M |
| Puffer für Western-Blot | | |
| 10x TBS, pH 7,6 | NaCl | 1,37 M |
| | Tris | 200 mM |
| Antikörper-Inkubations-Lösung I (in 1x TBS) | Milchpulver | 1 % |
| | Tween-20 | 0,1 % |
| Antikörper-Inkubations-Lösung II (in 1x TBS, für phosphospezifische Antikörper) | BSA | 5 % |
| Blockierungspuffer (in 1x TBS) | Milchpulver | 10 % |
| Milder Stripping-Puffer, pH 2,2 | Glycin | 200 mM |
| | SDS | 0,1 % |
| | Tween-20 | 1 % |
| Transferpuffer für Semidry-Western-Blot | Glycin | 39 mM |
| | Methanol | 20 % |
| | SDS | 1,3 mM |
| | Tris | 48 mM |
| Transferpuffer für Wet-Western-Blot (Towbin-Puffer) | Glycin | 192 mM |
| | Methanol | 20 % |
| | Tris | 25 mM |
| Waschpuffer „TBS-T“ (in 1x TBS) | Tween-20 | 0,1 % |
| Puffer für Immunfluoreszenz | | |
| Blockierungspuffer und Antikörper-Inkubations-Lösung (in PBS _{def}) | FCS | 1 % |
| Fixierlösung (in PBS _{def}) | PFA | 3 % |
| Permeabilisierungspuffer (in PBS _{def}) | Triton X-100 | 0,5 % |
| Puffer für Ubiquitin-Pulldowns | | |
| TBS-T für Ubiquitin-Pulldowns, pH 8,0 | NaCl | 15 mM |
| | Tris-HCl | 20 mM |
| | Tween-20 | 0,1 % |
| Sonstige Puffer | | |
| PBS _{def} (ad 1 l H ₂ O) | KCl | 0,2 g |
| | KH ₂ HPO ₄ | 0,2 g |
| | NaCl | 8 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,15 g |

5.10 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|------------------|
| Chemikalien und Reagenzien | |
| 3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) | Sigma-Aldrich |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) | Sigma-Aldrich |
| Acrylamid/Bis (Rotiphorese 30), 30 % | Roth |
| Actinomycin D | Sigma-Aldrich |
| Agarose | Serva |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich |
| Ampicillin-Ratiopharm 1,0 g N3 | Ratiopharm |
| Bacto-Agar | Becton Dickinson |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich |
| Bradford-Reagenz | Bio-Rad |
| Bromphenolblau (BPB) | Sigma-Aldrich |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Merck |
| Chk-Inhibitor AZD7762-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) | Novagen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich |
| Doxorubicin-Hydrochlorid | Sigma-Aldrich |
| Essigsäure | Merck |
| Ethanol absolut (EtOH) | Sigma-Aldrich |
| Ethanol vergällt (EtOH) | Sigma-Aldrich |
| Ethidiumbromid | Promega |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Roth |
| FluorSave Reagent | Calbiochem |
| Glycerol | Roth |
| Glycin | Roth |
| Hefeextrakt | Merck |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich |
| Kaliumacetat | Merck |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck |
| Kanamycinsulfat | Sigma-Aldrich |
| Koffein | Sigma-Aldrich |
| Kristallviolett | Sigma-Aldrich |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | NEB |
| Mangan(II)-chlorid (MnCl ₂) | NEB |
| Methanol (MeOH) | Sigma-Aldrich |
| MG132 | Sigma-Aldrich |
| Milchpulver | Saliter |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich |
| Natriumchlorid (NaCl) | Riedel-de-Haën |
| Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS) | Merck |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Riedel-de-Haën |

| | |
|--|----------------------|
| NP-40 | Sigma-Aldrich |
| Orange Loading Dye, 6x | NEB |
| Paraformaldehyd (PFA) | Roth |
| Pepton | Merck |
| Phosphatase-Inhibitor Cocktail Set II | Calbiochem |
| Protease-Inhibitor Cocktail (Complete) | Roche |
| Salzsäure (HCl) | Merck |
| Stickstoff, 99 % | Messer-Griesheim |
| T-Per Tissue Protein Extraction Reagent | Thermo Fisher |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) | Acros Organics |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich |
| TUBE 2 Agarose | Tebu-Bio |
| Tween-20 | Serva |
| α -Amanitin | AppliChem |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |
| Verbrauchsmaterialien | |
| Chromatographie-Papier FP2668 | Kobe |
| Deckgläser, Ø 12 mm | Menzel |
| Extra Thick Blot Paper Protean | Bio-Rad |
| Gewebekulturröhrchen (TC tube) | Greiner Bio-One |
| Kanülen, Omnifix, 21-G $\frac{1}{2}$ – 27-G $\frac{3}{4}$ | Braun |
| Kryoröhrchen | Sarstedt |
| MicroAmp Optical 96-Well Optical Adhesive Films | Life Technologies |
| MicroAmp Optical 48-Well Optical Adhesive Films | Life Technologies |
| MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate | Life Technologies |
| MicroAmp Optical 48-Well Reaction Plate | Life Technologies |
| Mikroschraub Röhrchen | Sarstedt |
| Objektträger, 76 x 22 mm | Menzel |
| Parafilm | Pechiney Plastic |
| PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml | Biozym |
| Petrischalen | Sarstedt |
| Pipetten (Glas) | Hirschmann TechColor |
| Pipettenspitzen, Tip-One, 0,1 - 1000 μ l | Starlab |
| Polypropylen-Reaktionsgefäße (Falcon), 15 - 50 ml | Greiner Bio-One |
| Polysterol-Küvetten | Sarstedt |
| Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran Immobilion-P, 0,45 μ M | Millipore |
| Reaktionsgefäße, 1,5 ml | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße, 2 ml | Eppendorf |
| Skalpell, Nr. 22 | Feather |
| Sterilfilter, Ø 0,22 μ m | Schleicher & Schuell |
| Zellkulturflaschen, 25 - 175 cm ² | Greiner Bio-One |
| Zellkulturplatten, 6-, 12-, 24-, und 48-Well | Greiner Bio-One |
| Zellschaber | Roth |

5.11 Geräte und Software

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|-----------------------|
| Geräte für die Zellkultur | |
| Einfrierbox Mr. Frosty | Thermo Scientific |
| HeraCell 240 Inkubator | Thermo Fisher |
| HeraSAFE Biologische Sicherheitswerkbank | Thermo Fisher |
| Wasserbad | Köttermann |
| Zählkammer Neubauer, 0,0025 mm ² | Marienfeld |
| Zentrifugen | |
| Tischzentrifuge Mikro 200R | Hettich Zentrifugen |
| Zentrifuge 5810 R | Eppendorf |
| Mikroskope | |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M | Carl Zeiss |
| Mikroskop Primo Vert | Carl Zeiss |
| Geräte für DNA- und RNA-Analysen | |
| DNA-Gelkammern | Bio-Rad |
| NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 | PeqLab |
| UV-Schirm, 302 nm | Bachofer |
| Veriti 96-Well Thermalcycler | Applied Biosystems |
| Geräte für SDS-PAGE und Western-Blot | |
| Criterion Blotter | Bio-Rad |
| Entwicklermaschine Optimax 2010 | Protec Medizintechnik |
| Membrandokumentationssystem ChemiDoc XRS+ | Bio-Rad |
| Mini Trans-Blot Cell | Bio-Rad |
| Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell | Bio-Rad |
| Sonstige Geräte | |
| Eismaschine | Ziegra |
| Feinwaage | Sartorius |
| Handy Step electronic | Brand |
| Magnetrührer MR 2000 | Heidolph |
| Mikrowellengerät | Bosch |
| pH-Meter CG822 | Schott Geräte |
| Pipettierhilfe accu-jet pro | Brand |
| Power Supplies | Bio-Rad |
| Reagenzglasmixer Vortex | Heidolph |
| Schüttler HS250 basic | IKA Labortechnik |
| Transferpette, 10 - 1000 µl | Brand |
| Ultraschallbad | Branson |
| WPA Lightwave II Spektrophotometer | Biochrom |
| Software | |
| Axio Vision 4 | Carl Zeiss |
| Bio-Rad Image Lab | Bio-Rad |
| EndNote Web | EndNote |

| | |
|--|--------------------|
| Geldokumentationssystem GelDoc 2000 | Bio-Rad |
| Ingenuity Pathway Analysis Software | Ingenuity |
| Microsoft Office Word, Excel, PowerPoint 2010/2013 | Microsoft |
| StepOne Software v2.1 | Applied Biosystems |

6 Methoden

6.1 Virologische Methoden

6.1.1 Virusproduktion

Für die Produktion von Virus werden BHK-Zellen (siehe 5.2.1) verwendet, die so ausgesät werden, dass sie am Tag der Infektion in einer 175 cm²-Flasche zu 30 % konfluent sind. Für die Infektion wird das Zellkulturmedium (siehe 5.2.3) abgesaugt und die Zellen werden einmal mit PBS_{def} (siehe 5.9) gewaschen. Dann werden die Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 10⁻³ (rLACVdelNSs) oder mit einer MOI von 10⁻⁴ (alle anderen Viren) infiziert, wobei die Viren in 5 ml Infektionsmedium (siehe 5.2.3) aufgenommen werden, welches dann langsam auf den Zellrasen pipettiert wird. Es erfolgt eine Inkubation für 60 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit), während der die Zellen alle 10 min leicht geschwenkt werden. Nach der Inkubationszeit werden 15 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium zu den Zellen und dem Virusinokulum hinzugegeben. Die infizierten Zellen werden dann für drei Tage im Inkubator inkubiert. Dann wird mit Hilfe eines Lichtmikroskops festgestellt, ob ein zytopathischer Effekt (*cytopathic effect*, CPE) vorhanden ist. Ist dies der Fall, wird der virushaltige Überstand in ein 50 ml-Falcon überführt. Um alle toten Zellen zu entfernen, wird der Überstand bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert und dann in ein neues 50 ml-Falcon gegeben. Dieser virushaltige, zellfreie Überstand wird in Kryoröhrchen à 1 ml aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren. Danach erfolgen Titerbestimmung (siehe 6.1.2) und Virusverifizierung (siehe 6.1.3).

6.1.2 Titerbestimmung mittels Plaque-Assay

Mit Hilfe eines Plaque-Assays wird die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (*plaque forming units*, PFU) pro ml Virusprobe gemessen. Ein Plaque entsteht genau dann, wenn ein Virus eine Zelle infiziert hat und es dadurch zur Lyse der Zelle und zur Freisetzung von Virus gekommen ist. Dadurch werden nebenstehende Zellen infiziert, die wiederum lysiert werden.

CV1-Zellen (siehe 5.2.1) werden in Wells einer 12-Well-Platte so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion 90 % konfluent sind. Das zu titrierende Virus wird mit Infektionsmedium in einer Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-6} verdünnt. Die Zellen werden nach Absaugen des Zellkulturmediums einmal mit PBS_{def} gewaschen und danach mit jeweils 100 µl der Virusverdünnung versehen. Es erfolgt dann eine Inkubation für 60 min im Inkubator, während der die Zellen alle 10 min leicht geschwenkt werden. Nach der Inkubationszeit wird das Virusinokulum abgesaugt und 1 ml vorgewärmtes Avicelmedium (siehe 5.2.3) auf die Zellen gegeben. Dieses Medium verhindert, dass die Virusinfektion sich über das Medium ausbreitet. Die infizierten Zellen werden dann für drei Tage im Inkubator inkubiert, um die Plaques identifizieren zu können. Nach drei Tagen wird 1 ml 20 %-TCA-Lösung (siehe 5.2.3) auf die Zellen gegeben und für 10 min inkubiert, damit die Zellen fixiert werden. Der Überstand wird dann abgesaugt und die Zellen werden so lange mit PBS_{def} gewaschen, bis keine Reste vom Avicelmedium mehr vorhanden sind. Danach wird 1 ml einer Kristallviolett-Lösung (siehe 5.2.3) auf die Zellen gegeben und es erfolgt eine Inkubation für 10 min. Die Kristallviolett-Lösung wird danach abgesaugt und die Zellen werden so lange mit PBS_{def} gewaschen, bis die durch das Virus verursachten Plaques sichtbar sind. Nach Auszählen der Plaques kann mit Hilfe der Formel $\frac{PFU}{ml} = Anzahl\ Plaques \cdot 10 \cdot \frac{1}{Verdünnungsfaktor}$ der Titer der Viruslösung berechnet werden.

6.1.3 Virusverifizierung

6.1.3.1 Virusverifizierung via Enzymverdau

Die Produktion von rekombinantem Virus (siehe 6.1.1) wird mittels EcoRI-Enzymverdau überprüft. Wildtypisches LACV verfügt auf dem S-Segment an Position 572 über eine EcoRI-Schnittstelle, wohingegen rekombinantes Virus eine stille Mutation an dieser Stelle trägt, so dass die EcoRI-Schnittstelle nicht existiert (Blakqori & Weber, 2005).

Für den EcoRI-Verdau wird RNA mit Hilfe des Viral RNA Mini Kit von Qiagen (siehe 5.8) extrahiert. Um jegliche DNA-Spuren zu beseitigen, erfolgt ein DNA-Verdau mit 1 µl DNase (siehe 5.7) bei 37 °C für 30 min, für den 1 µg RNA eingesetzt wird. Die gereinigte RNA wird dann für eine RT-PCR eingesetzt, die mit dem OneStep RT-PCR Kit von Qiagen (siehe 5.8) und den Primern # 148 und # 149 (siehe 5.5.1) bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C durchgeführt wird. Dann erfolgt eine PCR-Aufreinigung mit Hilfe des PCR Purification Kit von Qiagen (siehe 5.8). Für den EcoRI-Verdau wird der komplette Elutionsansatz der DNA-Aufreinigung verwendet und mit 1 µl

EcoRI (siehe 5.7) verdaut; der Verdau wird durchgeführt bei 37 °C für 1 h. Das EcoRI-Enzym wird dann noch für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Danach wird die DNA auf einem 1 %-Agarosegel aufgetragen und einer Elektrophorese bei 100 V für 45 min unterzogen. Das 1 %-Agarosegel wird für 30 min in Ethidiumbromid inkubiert und danach mittels UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) analysiert. DNA von wildtypischem LACV wird durch das EcoRI-Enzym in zwei Fragmente à 572 und 217 Basenpaare (bp) zerschnitten, DNA von rekombinantem Virus dahingegen nicht.

6.1.3.2 Virusverifizierung via Sequenzierung

Produzierte Viren werden zusätzlich zu der EcoRI-Kontrolle (siehe 6.1.3.1) sequenziert. Hierzu werden 600 ng DNA aus der oben genannten aufgereinigten RT-PCR-Reaktion mit jeweils 10 pmol Primer # 148 beziehungsweise Primer # 149 zum Sequenzieren an die Firma Seqlab geschickt. Durch die Sequenzierung kann analysiert werden, ob sich in dem rekombinanten LACVdelNSs die gewünschten Mutationen, die dazu führen, dass das NSs-Protein nicht exprimiert wird (siehe 3.5), befinden.

6.1.4 Infektion von eukaryotischen Zellen

In dieser Arbeit wurden eukaryotische Zellen (siehe 5.2.1) mit einer MOI von 10^{-4} , 10^{-3} , 5 oder 10 infiziert, wobei das Volumen an Virus, das benötigt wurde, nach der Formel $\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{Virustiter} \left[\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right]} =$

$\text{MOI} \cdot \text{erwünschte MOI} \cdot 1000 = x \text{ } [\mu\text{l}]$ berechnet wurde.

Einen Tag vor der Infektion werden Zellen in einer definierten Anzahl pro Well ausgesät, um eine Konfluenz von 60 % zu erreichen. Anhand der ausgesäten Zellzahl kann die Anzahl der Zellen am nächsten Tag geschätzt (Verdopplungszeit der Zellen circa 24 h) und somit das Volumen an Virus für die benötigte MOI errechnet werden. Das Virus wird für die Infektion von Zellen in einer 12-Well-Zellkulturplatte in 100 μl Infektionsmedium aufgenommen. Für die Infektion von Zellen in einer 6-Well-Zellkulturplatte werden 200 μl Infektionsmedium verwendet, für 25 cm^2 -Flaschen 1 ml, für 75 cm^2 -Flaschen 2 ml und für 175 cm^2 -Flaschen 5 ml. Das Zellkulturmedium wird abgesaugt und die Zellen werden einmal mit PBS_{def} gewaschen. Danach wird das in Infektionsmedium befindliche Virus langsam auf die Zellen gegeben. Es erfolgt dann eine Inkubation im Inkubator für 60 min, in der die Zellen alle 10 min geschwenkt werden. Nach der Inkubationszeit

wird das Virusinokulum abgesaugt und die Zellen werden mit entsprechendem Zellkulturmedium versetzt. Nach einer bestimmten Infektionszeit (in dieser Arbeit 2, 4, 8, 16/18 oder 24 h) werden die Zellen für die weitere Analyse vorbereitet.

6.2 Zellkultur von eukaryotischen Zellen

6.2.1 Kultivieren von eukaryotischen Zellen

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um permanente Zelllinien, die in 75 cm²-Zellkulturflaschen im Inkubator kultiviert werden. Als Wachstumsmedium wird für HeLa-Zellen das in 5.2.3 genannte „Zellkulturmedium HeLa“ verwendet; für alle anderen wird das normale Zellkulturmedium verwendet. Die Passage der Zelllinien findet *alle* 3 bis 4 Tage unter einer Sicherheitswerkbank statt. Hierzu wird der konfluente Zellrasen nach Absaugen des Zellkulturmediums mit vorgewärmtem sterilen PBS_{def} einmal gewaschen und durch Zugabe von 2 ml 0,05 % Trypsin-EDTA vom Flaschenboden im Inkubator abgelöst. Die durch das Trypsin-EDTA hervorgerufene Ablösung wird durch Zugabe von 8 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium abgestoppt, die Zellen werden resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung oder Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche oder -platte ausgesät. Je nach Zelllinie wird das Zellkulturmedium um Selektionsmarker (Geneticin, Puromycin) ergänzt.

6.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Für eine längerfristige Aufbewahrung von Zellen können diese oberhalb von flüssigem Stickstoff gelagert werden. Für das Einfrieren werden konfluent bewachsene 175 cm²-Flaschen einmal mit vorgewärmtem sterilen PBS_{def} gewaschen und dann durch Zugabe von 5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA vom Flaschenboden im Inkubator abgelöst. Die durch das Trypsin-EDTA hervorgerufene Ablösung wird durch Zugabe von 15 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium abgestoppt, die Zellen werden resuspendiert und in ein steriles 50 ml-Falcon gegeben. Die Zellsuspension wird dann 5 min bei 800 rpm zentrifugiert; danach wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet wird in 20 ml

einer 1:10-Mischung aus DMSO und Zellkulturmedium aufgenommen. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird in ein gekühltes Kryoröhrchen gegeben und in einer gekühlten (-20 °C), mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox über Nacht langsam bei -80 °C abgekühlt. Im Anschluss erfolgt der Transfer in die Gasphase oberhalb flüssigen Stickstoffs.

Um die Zelllinien zu rekultivieren, werden die tiefgefrorenen Zellen bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wird in 4 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium aufgenommen und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag werden die angewachsenen Zellen wie in 6.2.1 beschrieben weiterkultiviert.

6.2.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

6.2.3.1 Transfektion von DNA-Plasmiden

In dieser Arbeit erfolgte die Transfektion von DNA-Plasmiden zunächst mit dem Nanofectin Kit von PAA und, als dieses nicht mehr erhältlich war, mit dem TransIT-LT1-Reagenz von Mirus Bio LLC.

Je nach Versuchsansatz werden die zu verwendenden Zellen normal oder revers transfiziert. Bei der normalen Transfektion werden Zellen in Wells von 12-Well-Zellkulturplatten so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion 60 % konfluent sind. Bei einer reversen Transfektion wird das Transfektionsreagenz zuerst in ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte vorgelegt und erst darauf werden die auszusäenden Zellen in einer Konzentration gegeben, dass sie am nächsten Tag zu 60 % konfluent sind.

Transfektion mit Nanofectin:

Für einen einzelnen Transfektionsansatz mit Nanofectin wird 0,5 µg DNA in einem Reaktionsgefäß mit 50 µl Opti-MEM gemischt, kurz gevortext und mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Um das vom Hersteller angegebene optimale DNA-Nanofectin-Verhältnis zu verwenden, werden in einem weiteren Reaktionsgefäß 1,6 µl Nanofectin mit 50 µl Opti-MEM vermischt, ebenfalls kurz gevortext und mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dann wird das Gemisch aus Transfektionsreagenz und Opti-MEM zu dem DNA-/Opti-MEM-Gemisch hinzugegeben; dieses Gemisch wird wieder kurz gevortext und mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach 15 bis 30 min Inkubationszeit wird das Nanofectin-/DNA-Opti-MEM-Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen (normale

Transfektion) beziehungsweise direkt in ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte (reverse Transfektion) gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgt nicht. Nach 24 h Inkubationszeit werden die Zellen entweder für die weitere Analyse lysiert oder infiziert.

Transfektion mit TransIT-LT1:

Für einen einzelnen Transfektionsansatz mit TransIT-LT1 wird 0,5 µg DNA in einem Reaktionsgefäß mit 100 µl Opti-MEM durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Da das vom Hersteller optimale DNA-TransIT-LT1-Verhältnis 1:3 ist, werden 1,5 µl TransIT-LT1 zu dem DNA-Opti-MEM-Gemisch hinzugegeben und wieder durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 30 min wird das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Zellen (normale Transfektion) oder direkt in ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte gegeben (reverse Transfektion). Auch hier erfolgt kein Mediumwechsel. Nach 24 h Inkubationszeit werden die Zellen entweder für die weitere Analyse lysiert oder infiziert.

6.2.3.2 Transfektion von siRNA

Die Transfektion von siRNA erfolgt mit Lipofectamine RNAiMAX von Life Technologies. Sie wird revers ausgeführt, das heißt, dass ein siRNA-Transfektionsgemisch in ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte vorgelegt wird und darauf Zellen in Zellkulturmedium ausgesät werden.

Für den Knockdown von Nedd4 werden HeLa-Zellen (siehe 5.2.1), für den Knockdown der 7SK-RNA werden A549-Zellen (siehe 5.2.1) verwendet. 50 nM siRNA (finale Konzentration) werden in einem Reaktionsgefäß in 100 µl Opti-MEM aufgenommen und durch Vortexen vermischt; danach wird mit einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. In einem anderen Reaktionsgefäß werden 1,6 µl Lipofectamine RNAiMAX mit 100 µl Opti-MEM vermischt, ebenfalls kurz gevortext und mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Dann wird das siRNA-Opti-MEM-Gemisch zu dem Lipofectamine RNAiMAX-Opti-MEM-Gemisch gegeben. Dieses Gemisch wird wieder gevortext und mit Hilfe einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach 5 min Inkubationszeit wird der Ansatz in ein Well einer 12-Well-Zellkulturplatte vorgelegt, so dass darauf Zellen in der erwünschten Konzentration ausgesät werden können. 4 h nach Transfektion wird mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert, ob sich alle Zellen auf dem Boden abgesetzt haben; wenn dies der Fall ist, kann ein Mediumwechsel stattfinden. Insgesamt erfolgt die Inkubation der Zellen mit siRNA für 48 h. Im Falle eines Knockdowns der 7SK-RNA werden die Zellen nach dieser Inkubationszeit infiziert und weiter analysiert. Im Falle eines Knockdowns von Nedd4 werden die Zellen ein weiteres Mal mit siRNA transfiziert. Dazu wird der in den Wells der 12-Well-Zellkulturplatte vorhandene Über-

stand abgesaugt und die Zellen werden einmal mit vorgewärmten PBS_{def} gewaschen. Dann werden sie mit Hilfe von 500 µl 0,05 % Trypsin-EDTA im Inkubator vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst. Die Reaktion wird mit 1,5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium abgestoppt und alle Zellen, die mit derselben siRNA behandelt worden sind, werden vermischt. Nun wird erneut siRNA wie oben beschrieben zusammenpipettiert und in Wells einer neuen 12-Well-Zellkulturplatte gegeben. Darauf werden die abgelösten, einfach-transfizierten Zellen in der gewünschten Konzentration ausgesät. Nach 4 h erfolgt wieder ein Mediumwechsel. Die gesamte Inkubationsdauer beträgt nach der zweiten Transfektion nur 24 h; danach werden die Zellen infiziert und weiter analysiert.

6.2.4 Mycoplasmentest und -behandlung

Zellen und Virusstocks werden mittels PCR (*polymerase chain reaction*, siehe 6.4.2) auf Mycoplasmen getestet und im Falle eines positiven Ergebnisses mit Plasmocin von InvivoGen behandelt.

Für die Mycoplasmen-PCR wird aus dem Zellkulturmedium der zu testenden Zelllinie oder des Virusstocks mit Hilfe des Qiagen Viral RNA Mini Kit DNA isoliert. Dann erfolgt eine PCR mit der JumpStart Taq DNA-Polymerase (siehe 5.7) und den Mycoplasmen-spezifischen Primern # 437 und # 438 (siehe 5.5.1, Reaktionsansatz und PCR-Programm siehe Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Reaktionsansatz und PCR-Programm für Mycoplasmen-Test

| Reaktionsansatz | | |
|---|----------|--------------|
| Komponente | Volumen | |
| Primer # 437 (100 µM, finale Konzentration 1 µM) | 0,25 µl | |
| Primer # 438 (100 µM, finale Konzentration 1 µM) | 0,25 µl | |
| dNTPs (2 mM, finale Konzentration 0,12 mM) | 1,5 µl | |
| MgCl ₂ (50 mM, finale Konzentration 1,66 mM) | 0,83 µl | |
| JumpStart Taq DNA-Polymerase | 0,5 µl | |
| H ₂ O | 20,67 µl | |
| DNA aus DNA-Isolation | 1 µl | |
| PCR-Programm | | |
| Temperatur | Zeit | Wiederholung |
| 94 °C | 5 min | --- |
| 94 °C | 30 sec | x 35 |
| 55 °C | 30 sec | |
| 72 °C | 30 sec | |
| 72 °C | 10 min | --- |

Das PCR-Produkt wird dann auf einem 1,5 %-Agarosegel aufgetragen und bei 100 V einer Elektrophorese für 45 min unterzogen. Danach wird das 1,5 %-Agarosegel für 30 min in Ethidiumbromid inkubiert und mittels UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) analysiert.

Im Falle eines positiven PCR-Ergebnisses werden die Zellen über mehrere Tage bis Wochen hinweg mit 25 $\mu\text{g/ml}$ Plasmocin, das dem Zellkulturmedium zugegeben wird, behandelt.

6.3 Zellkultur von prokaryotischen Zellen

6.3.1 Herstellung von LB-Agarplatten

Für die Herstellung von Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatten wird autoklaviertes LB-Medium mit 1,5 % Agar (siehe 5.3.2) versetzt, erhitzt und nach Abkühlung mit Antibiotikum (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin oder 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) versetzt. Dann werden die Platten gegossen, ausgehärtet und bei 4 °C bis zum späteren Gebrauch gelagert.

6.3.2 Herstellung von kompetenten DH10B-Bakterien

Am ersten Tag der Herstellung von kompetenten DH10B-Bakterien (siehe 5.3.1) werden 100 μl von vorher schon kompetent-hergestellten Bakterien in 10 ml LB-Medium (siehe 5.3.2) ausgesät und für 16 h bei 37 °C auf dem Schüttler mit 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wird 1 ml der Über-Nacht-Kultur in 100 ml LB-Medium gegeben und für circa 2 bis 2,5 h bei 37 °C auf dem Schüttler mit 220 rpm inkubiert. Die optische Dichte (OD) wird regelmäßig mit einem WPA Light-wave II Spektrophotometer gemessen. Ist eine OD zwischen 0,5 und 0,7 erreicht, werden die Bakterien in zwei 50 ml-Falcons überführt und für 10 min bei 3.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Bakterienpellets werden vorsichtig in jeweils 30 ml TBF-1-Lösung (siehe 5.3.2) resuspendiert und dann für 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt dann eine erneute Zentrifugation bei 2.000 rpm und 4 °C für 10 min. Die Pellets werden dann in jeweils

2 ml TBF-2-Lösung (siehe 5.3.2) resuspendiert. Danach werden auf Eis Aliquots à 100 µl hergestellt, die zum schnellen Einfrieren in flüssigen Stickstoff gehalten werden. Die Aliquots können dann bei -80 °C gelagert werden.

6.3.3 Transformation und Selektion von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Für die Einbringung von Plasmid-DNA in kompetente DH10B-Bakterien (siehe 6.3.2), werden 30 µl der Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgt ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C im Wasserbad und direkt danach werden die Bakterien für 2 min auf Eis gestellt. Dann werden 250 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zu dem Ansatz hinzugegeben und die Bakterien werden für 60 min bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Danach können 50 - 100 µl des Ansatzes auf LB-Agar-Platten (siehe 6.3.1), die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurden, ausplattiert werden. Nach einer Inkubation für 16 h bei 37 °C kann man Kolonien picken und diese in LB-Medium geben, so dass sich die Plasmid-enthaltenden Bakterien für die Plasmid-Isolierung (siehe 6.4.1) vermehren können.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Einzelne, nach einer Transformation erhaltene Bakterienkolonien (siehe 6.3.3), werden in 100 ml LB-Medium, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) versetzt wurde, aufgenommen und für 16 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Mit Hilfe eines DNA-Isolierungs-Kits (siehe 5.8) wird die Plasmid-DNA aus den Bakterien aufgereinigt. In dieser Arbeit wurde zunächst das NucleoBond PC100 Kit von Macherey-Nagel verwendet, später das E.Z.N.A. Plasmid Midi Kit von Omega Bio-Tek. Das Prinzip dieser beiden Kits beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien, der darauffolgenden Präzipitation der genomischen DNA, sowie der Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA über ein Säulensys-

tem. Um sicherzustellen, dass die DNA nicht fragmentiert ist, wird sie auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetragen und bei 100 V für 45 min einer Elektrophorese unterzogen. Das 1 %-Agarosegel wird für 30 min in Ethidiumbromid inkubiert und mit Hilfe von UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) wird die DNA sichtbar gemacht. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt mit einem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000.

6.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird verwendet, um spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* zu vervielfältigen. Dient die PCR der Diagnostik, zum Beispiel bei einem Mycoplasmentest (siehe 6.2.4), wird die JumpStart Taq-DNA Polymerase verwendet, dient sie der Herstellung neuer Plasmid-DNA, werden Polymerasen verwendet, die über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität verfügen, die Fehler während der Amplifikation erkennen und diese entfernen. Um eine DNA-Sequenz zu vervielfältigen, benötigt man Oligonukleotide („Primer“, siehe 5.5.1), die jeweils am 5'- und am 3'-Ende der DNA-Sequenz binden und diese einrahmen. Die PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten: Aufbruch der Wasserstoffbrückenbindungen der DNA, so dass diese in Einzelsträngen vorliegt (Denaturierung), Bindung der Primer an die DNA-Sequenz (Annealing) und Synthese des DNA-Doppelstranges (Elongation). Ein solcher Reaktionszyklus durchläuft bis zu 40 Wiederholungen, wobei die zu amplifizierende DNA exponentiell angereichert wird. Ein Beispiel für einen Reaktionsansatz mit der JumpStart Taq DNA Polymerase kann in Tabelle 6.1 nachgesehen werden. Das PCR-Produkt kann anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt (siehe 6.4.3) oder mit Hilfe eines Agarosegels analysiert werden. Hierbei bestimmt die Agarose-Konzentration die Porengröße der Gelstruktur und beeinflusst so die Auftrennungsgeschwindigkeit der einzelnen DNA-Moleküle. Mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid und von UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) kann die DNA sichtbar gemacht werden.

6.4.3 DNA-Aufreinigung

Werden DNA-Fragmente beispielsweise in einer PCR hergestellt (siehe 6.4.2), müssen eventuelle Kontaminationen wie Phenol, Chloroform, Ethanol, Salze oder Proteine entfernt werden. Sind

die DNA-Fragmente größer als 100 bp, so können sie mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt werden, wobei diese Aufreinigung über eine Säulenmatrix nach der beiliegenden Arbeitsanleitung erfolgt.

6.4.4 RNA-Aufreinigung

6.4.4.1 RNA-Aufreinigung aus Zellen

Mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen (siehe 5.8) kann RNA aus eukaryotischen Zellen, die zuvor transfiziert oder infiziert wurden, aufgereinigt werden. Das Prinzip der RNA-Aufreinigung beruht auf der Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran, die sich in kleinen Säulen befindet. Die Aufreinigungsprozedur erfolgt nach der beiliegenden Arbeitsanleitung; die RNA wird in 30 µl H₂O eluiert und die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit dem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000.

6.4.4.2 RNA-Aufreinigung aus Zellkultur-Überständen

Das Viral RNA Mini Kit von Qiagen (siehe 5.8) wird verwendet, um RNA aus Zellkultur-Überständen aufzureinigen, beispielsweise aus Virus-haltigem Zellkulturmedium nach einer Infektion (siehe 6.1.1). Das Kit kann auch dazu verwendet werden, um Mycoplasmen-DNA aus dem Zellkultur-Überstand zu isolieren (siehe 6.2.4). Auch hier beruht das Prinzip der RNA-Aufreinigung auf der Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran, die sich in kleinen Säulen befindet. Die Aufreinigungsprozedur erfolgt nach der beiliegenden Arbeitsanleitung. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit dem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000.

6.4.5 Quantitative „Real-Time-PCR“

Mit Hilfe der quantitativen „Real-Time-PCR“ (qRT-PCR, quantitative Echtzeit-PCR) können DNA-Sequenzen nicht nur vervielfältigt, sondern gleichzeitig auch quantifiziert werden. Die Quantifizierung der vervielfältigten DNA gibt einen Rückschluss auf spezifische RNA-Mengen in untersuchten Zellen. Für diese Methode wird zuerst RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert (siehe 6.4.4.1) und die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 gemessen. Je nach Versuch findet der Verdau der zellulären DNA entweder während der

RNA-Aufreinigung mit Hilfe des RNase-Free DNase Set von Qiagen (siehe 5.8) oder nach der Konzentrationsmessung mit der DNaseI von Fermentas statt. Für die qPCR werden 10 ng DNA-freie RNA eingesetzt. Die qPCR wird mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR von Qiagen (siehe 5.8) durchgeführt, welches sowohl die reverse Transkription als auch die eigentliche DNA-Vervielfältigung und Quantifizierung ermöglicht. Als Primer können teilweise kommerzielle, von Qiagen validierte Oligonukleotide, teilweise auch Primer, die nicht speziell für qPCR validiert worden sind, verwendet werden (siehe 5.5.1). Die qPCR-Reaktion (siehe Tabelle 6.2) findet in einem StepOne Real-Time PCR System von Applied Biosystems statt und die relativen RNA-Mengen werden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode errechnet, wobei GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als internes Kontrollgen verwendet wird. Für jedes analysierte Gen wird eine Reaktion ohne RNA angesetzt, um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen.

Tabelle 6.2: Reaktionsansatz und PCR-Programm für eine qPCR-Reaktion mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen

| Reaktionsansatz | | |
|--|---------|--------------|
| Komponente | Volumen | |
| SYBR-Green | 12,5 µl | |
| Primer (100 µM, finale Konzentration 0,5 µM) | 2,5 µl | |
| oder | | |
| QuantiTect Primer (10x, finale Konzentration 1x) | 2,5 µl | |
| RT-Mix | 0,25 µl | |
| 10 ng RNA + H ₂ O | 9,75 µl | |
| PCR-Programm | | |
| Temperatur | Zeit | Wiederholung |
| 50 °C | 30 min | --- |
| 95 °C | 15 min | --- |
| 94 °C | 15 sec | x 35 |
| 55 °C | 30 sec | |
| 72 °C | 30 sec | |
| 72 °C | 10 min | --- |

6.5 Proteinbiochemische Methoden

6.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der SDS-PAGE (SDS: *sodium dodecyl sulfate*, Natriumsulfat; PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine unter reduzierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt. Proteine werden sowohl mit SDS als auch mit dem reduzierenden Thiol β -Mercaptoethanol versetzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Des Weiteren erhalten die Proteine durch die Zugabe von SDS eine konstante negative Ladung, wodurch sie sich in einem Polyacrylamid-Gel nach Anlegen einer Spannung von der Kathode in Richtung Anode bewegen können. Um das Lysat auf eine Stelle im Gel zu fokussieren, bestehen die Polyacrylamid-Gele aus einem 4 %-igen Sammelgel und, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, einem höherprozentigem Trenngel. Hierbei wird für Proteine von 10 bis 120 kDa ein 12 %-iges Trenngel, für Proteine über 120 kDa ein 5 %-iges Trenngel verwendet (siehe Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE für zwei Gele

| Bezeichnung | Sammelgel 4 % [ml] | Trenngel 12 % [ml] | Trenngel 5 % [ml] |
|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| H ₂ O | 6,1 | 3,4 | 5,7 |
| Acrylamid/Bis, 30 % | 1,3 | 4 | 1,7 |
| Sammelgelpuffer | 2,5 | --- | --- |
| Trenngelpuffer | --- | 2,5 | 2,5 |
| 10 % SDS | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 10 % APS | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| TEMED | 0,01 | 0,005 | 0,005 |

Zum Beladen der Polyacrylamid-Gele werden Proben vorbereitet, indem Zellen mit einem SDS-Probenpuffer (siehe 5.9) versehen werden und bei 105 °C für 5 min aufgeköcht werden. Aus diesem Lysat werden 10 - 15 μ l oder 10 μ g in jeweils eine Tasche eines Polyacrylamid-Gels gegeben und die Elektrophorese wird bei 25 mA pro Gel so lange durchgeführt, bis die Probenpuffer-Laufbande den unteren Rand des Polyacrylamid-Gels erreicht.

6.5.2 Elektrotransfer von Proteinen

Ein Elektrotransfer von Proteinen, der sogenannte „Western-Blot“, ist eine empfindliche Nachweismethode für Proteine, bei dem die Nachweisgrenze bei 1 pg liegt. Hierfür werden Proteine zuerst mittels SDS-PAGE (siehe 6.5.1) aufgetrennt und anschließend durch den Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran irreversibel an diese gebunden. Dadurch werden die Proteine für immunologische Nachweismethoden (siehe 6.5.3) zugänglich.

6.5.2.1 Semidry-Western-Blot

Der Semidry-Western-Blot wird durchgeführt für alle 12 %-igen Gele, mit denen man Proteine von 10 bis 120 kDa auftrennen kann. Hierfür wird die PVDF-Membran aktiviert, indem sie kurz in Methanol eingetaucht wird. Dann werden die PVDF-Membran und insgesamt sechs Filterpapiere mit dem Transferpuffer für Semidry-Western-Blot benetzt und wie folgt von oben nach unten geschichtet: drei Filterpapiere, SDS-Gel, PVDF-Membran, drei Filterpapiere. Der Transfer wird in einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio-Rad bei 10 V für 60 min durchgeführt.

6.5.2.2 Wet-Western-Blot

Für alle 5 %-igen Gele, die für Proteine, die größer als 120 kDa sind, verwendet werden, wird der Transfer mittels der Wet-Western-Blot-Methode durchgeführt. Hierbei befindet sich der Zusammenbau aus Filterpapieren, PVDF-Membran und SDS-Gel in einer Kammer, die komplett mit dem Transferpuffer für Wet-Western-Blot (Towbin-Puffer) gefüllt ist. Vor dem Zusammenbau der Komponenten wird auch hier die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert und, zusammen mit den Filterpapieren, mit Towbin-Puffer benetzt. Der Transfer findet für zwei Gele in einer Mini Trans-Blot Cell von Bio-Rad statt, für vier Gele in einem Criterion Blotter von Bio-Rad; er erfolgt bei konstanten 250 mA für 90 min.

6.5.3 Antikörperfärbung von auf PVDF-Membran transferierten Proteinen

Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (siehe 6.5.2) sind die Proteine für immunologische Nachweismethoden zugänglich. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird die PVDF-Membran in Blockierungspuffer (siehe 5.9) für 60 min bei Raumtempe-

ratur (RT) oder für 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wird die Membran dreimal mit dem Waschpuffer TBS-T (siehe 5.9) für 5 min gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation des Primärantikörpers. Diese erfolgt für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen in 1x TBS, in dem 5 % BSA gelöst wurde, oder, für alle anderen nachzuweisenden Proteine, in 1x TBS, das mit 1 % Milchpulver und 0,1 % Tween versetzt wurde (siehe 5.9). Die Inkubation erfolgt je nach nachzuweisendem Protein für 60 min bei RT oder für circa 16 h bei 4 °C. Nach dieser Inkubation wird die PVDF-Membran mindestens dreimal mit TBS-T für mindestens 10 min gewaschen und danach erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der mit der HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt ist. Die Inkubation erfolgt immer in 1x TBS, versetzt mit 1 % Milchpulver und 0,1 % Tween für 45 min auf dem Schüttler. Danach wird die PVDF-Membran einmal mit TBS-T für mindestens 10 min und zweimal mit 1x TBS, ebenfalls für mindestens 10 min, gewaschen, so dass danach eine Detektion des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgen kann. Dies erfolgt mit dem SuperSignal West Femto oder Pico Maximum Sensitivity Substrate von Thermo Fisher nach Gebrauchsanleitung. Die Belichtung der PVDF-Membran erfolgt mit dem Membrandokumentationssystem ChemiDoc XRS+ von Bio-Rad.

6.5.4 Entfernen von an PVDF-Membran gebundenen Antikörpern

Sollen für ein Experiment mehrere Proteine auf einer PVDF-Membran sichtbar gemacht werden, die die gleiche Größe besitzen oder deren Antikörper miteinander kreuzreagieren können, kann die PVDF-Membran „gestrippt“ werden, das heißt, die gebundenen Antikörper können entfernt werden. Hierzu wird ein sogenannter „milder Stripping-Puffer“ (siehe 5.9) verwendet, mit dem die PVDF-Membran zweimal für je 10 min auf dem Schüttler inkubiert wird. Danach wird die PVDF-Membran jeweils für 10 min zweimal mit TBS und einmal mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss daran kann die PVDF-Membran wieder wie in 6.5.3 beschrieben mit Antikörpern gefärbt werden.

6.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse werden eukaryotische Zellen auf runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 12 mm in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und entweder transfiziert, infiziert oder beides. Nach einer von dem Versuch abhängigen Inkubationszeit wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen werden einmal mit PBS_{def} gewaschen. Zur Fixierung wird dann 1 ml Fixierlösung, bestehend aus 3 % PFA in PBS_{def} (siehe 5.9), für 20 min auf die Zellen gegeben. Die Fixierlösung wird durch dreimaliges Waschen für 5 min mit PBS_{def} entfernt. Permeabilisiert werden die Zellen mit 1 ml 0,5 % Triton X-100 in PBS_{def} (Permeabilisierungspuffer, siehe 5.9) für 10 min. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, werden die Zellen für 60 min mit 1 ml Blockierungspuffer, bestehend aus 1 % FCS in PBS_{def} (siehe 5.9) inkubiert. Der Primärantikörper wird in 20 µl Blockierungspuffer verdünnt und auf ein Stück Parafilm gegeben, das sich in einer feuchten Kammer befindet. Darauf wird das Deckglas mit den fixierten, permeabilisierten und blockierten Zellen gegeben. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgt für 60 min. Danach werden die Zellen dreimal mit 1 ml Blockierungspuffer für jeweils 5 min gewaschen. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgt ebenso wie die Inkubation des Primärantikörpers. Danach werden die Zellen zweimal kurz in PBS_{def} und dann einmal in H₂O getaucht und dann mit der zellbewachsenen Seite nach unten mittels FluorSave Reagent von Calbiochem auf einem Objektträger eingedeckelt. Nach dem Trocknen der Eindeckflüssigkeit können die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht werden.

6.7 „Ubiquitin-Pulldowns“

Um den Ubiquitinylierungsstatus von Zellen zu untersuchen, werden sogenannte TUBEs (*tandem ubiquitin binding entities*) für „Ubiquitin-Pulldowns“ verwendet. Diese bestehen aus vier hintereinander gelagerten Ubiquitin-assoziierten Domänen (UBA) und wurden speziell für die Isolierung und Identifizierung von ubiquitinylierten Proteinen entwickelt (Hjerpe *et al.*, 2009). TUBEs zeigen eine 1000-fach erhöhte Affinität für Poly-Ubiquitin als eine einzelne UBA. Des Weiteren schützen TUBEs ubiquitinylierte Proteine vor einem Abbau und sind deswegen geeignet,

um ubiquitinylierte Proteine nachzuweisen, die in nur geringer Anzahl in der Zelle vorkommen. Die hier verwendeten TUBEs basieren auf UBA1 vom humanen RAD23A (*UV excision repair protein RAD23 homolog A*), ein Protein, das in der Nukleotidexzisions-Reparatur (NER) involviert ist. Sie sind gekoppelt an Agarosekügelchen („Beads“), die eine einfache Isolierung der ubiquitinylierten Proteine erlauben.

Für den Pulldown von ubiquitinylierten Proteinen werden Huh7-Zellen (siehe 5.2.1) in 75 cm²-Flaschen so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion zu 60 % konfluent sind. Die Infektion erfolgt mit einer MOI von 10 für insgesamt 5 h, wobei 3 h nach der Infektion die Zellen mit 20 µM des proteasomalen Inhibitors MG132 behandelt werden. Die Zellen werden für die Lyse mit 1 ml PBS_{def} benetzt und mit Hilfe eines Zellschabers aus der 75 cm²-Flasche abgekratzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dann werden die Zellen für 2 min bei 2.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das PBS_{def} wird abgesaugt und die Zellen werden in 500 µl RIPA-Puffer (siehe 5.9) resuspendiert. Zur kompletten Lyse der Zellen werden diese zweimal für jeweils 20 sec in einem Ultraschallbad sonifiziert, woraufhin dann eine Zentrifugation bei 13.200 rpm für 10 min bei 4 °C erfolgt. Der Überstand, der gelöste Proteine enthält, wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Für die Input-Kontrolle werden 80 µl davon entnommen, mit SDS-Probenpuffer vermengt und für 5 min bei 105 °C aufgeköcht. Der restliche Überstand wird bis zum eigentlichen Pulldown auf Eis verwahrt.

Für die Äquilibration der TUBEs (*tandem ubiquitin binding entities*)-Beads werden 20 µl Beads pro Probe entnommen und bei 1.000 x g für 5 min zentrifugiert. Die Beads werden dann in 1,5 ml TBS-T für Ubiquitin-Pulldowns (siehe 5.9) resuspendiert und auf einem Drehrad für 5 min inkubiert. Dann erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 1.000 x g für 5 min. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt; danach werden die Beads in dem ursprünglichen Volumen (20 µl pro Probe) aufgenommen.

Nach der Äquilibration der Beads werden jeweils 20 µl Beads zu einer Probe gegeben und auf dem Drehrad für 60 min bei 4 °C inkubiert. Hierbei erfolgt die Bindung von ubiquitinylierten Proteinen an die TUBEs-Beads. Der Ansatz wird dann bei 1.000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wird abgesaugt. Das Waschen der Beads erfolgt mit TBS-T für Ubiquitin-Pulldowns (siehe 5.9), versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren. Hierfür werden die Beads mit 1 ml TBS-T für Ubiquitin-Pulldowns auf einem Drehrad für 5 min inkubiert, dann bei 1.000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Dann wird der Überstand abgenommen und die Beads werden wieder in 1 ml TBS-T für Ubiquitin-Pulldowns resuspendiert. Das Waschen erfolgt insgesamt dreimal. Nach dem letzten Waschschrift erfolgt die Elution. Dafür wird das TBS-T für Ubiquitin-Pulldowns vollständig abgesaugt und die Beads werden mit 75 µl 1x SDS-Probenpuffer

versetzt und für 5 min bei 105 °C aufgeköcht. Dann werden die Beads bei 13.200 rpm für 5 min abzentrifugiert und der daraus resultierende Überstand wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand kann nun für die weitere Analyse mittels SDS-PAGE (siehe 6.5.1) und Western-Blot (siehe 6.5.2) verwendet werden.

7 Ergebnisse

7.1 Verifizierung des Abbaus von Rpb1 und der Interferon-Inhibition durch LACV WT

In Verbruggen *et al.* von 2011 wurde gezeigt, dass ein rekombinantes La Crosse-Wildtyp-Virus (rLACV WT) die hyperphosphorylierte Form der Rpb1-Untereinheit der RNA-Polymerase II (RNAPII) abbaut. In dieser Arbeit wurde mit, neben der auch in Verbruggen *et al.* (2011) verwendeten Deletionsmutante rLACVdelNSs, einem wildtypischen La Crosse-Virus (LACV WT) statt eines rekombinanten rLACV WT gearbeitet. Um sicherzugehen, dass auch LACV WT die Rpb1-Untereinheit der RNAPII abbaut und eine Interferon (IFN)-Inhibition induziert, wurden verschiedene Zelllinien infiziert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert und mittels Western-Blot oder qRT-PCR analysiert. Zunächst wurde jedoch verifiziert, dass mit einem wildtypischen LACV gearbeitet wurde und dass die Deletionsmutante immer noch die erforderlichen Mutationen trug.

7.1.1 Virusverifizierung von LACV WT und rLACVdelNSs

Um die Viren mittels Enzymverdau und Sequenzierung zu verifizieren, wurden MEF-STAT1^{-/-}-Zellen (siehe 5.2.1) mit einer MOI von 5 mit LACV WT oder rLACVdelNSs für 16 h infiziert (siehe 6.1.4). Virale RNA wurde dann extrahiert und nach einem DNaseI-Verdau mit Hilfe einer RT-PCR und LACV N-spezifischen Primern amplifiziert. Es erfolgte dann zum einen ein EcoRI-Enzymverdau (siehe 6.1.3.1), zum anderen wurde die amplifizierte DNA mit LACV N-spezifischen Primern zum Sequenzieren (siehe 6.1.3.2) geschickt.

Abbildung 7.1 A zeigt zum einen eine H₂O-Kontrolle, bei der H₂O statt viraler RNA für die RT-PCR eingesetzt wurde. Wie zu erwarten ist hier keine DNA-Bande zu sehen. In den beiden anderen Reihen erkennt man die durch Gel-Elektrophorese aufgetrennte DNA nach dem EcoRI-Enzymverdau von WT- und rLACVdelNSs-infizierten Zellen. Die amplifizierte DNA von LACV WT wurde

in zwei Fragmente à 572 und 217 Basenpaaren (bp) geschnitten. Die DNA von rLACVdelNSs hingegen konnte nicht geschnitten werden, da dieses Virus eine stille Mutation trägt, die die ursprünglich vorhandene Schnittstelle zerstört hat (Blakqori & Weber, 2005).

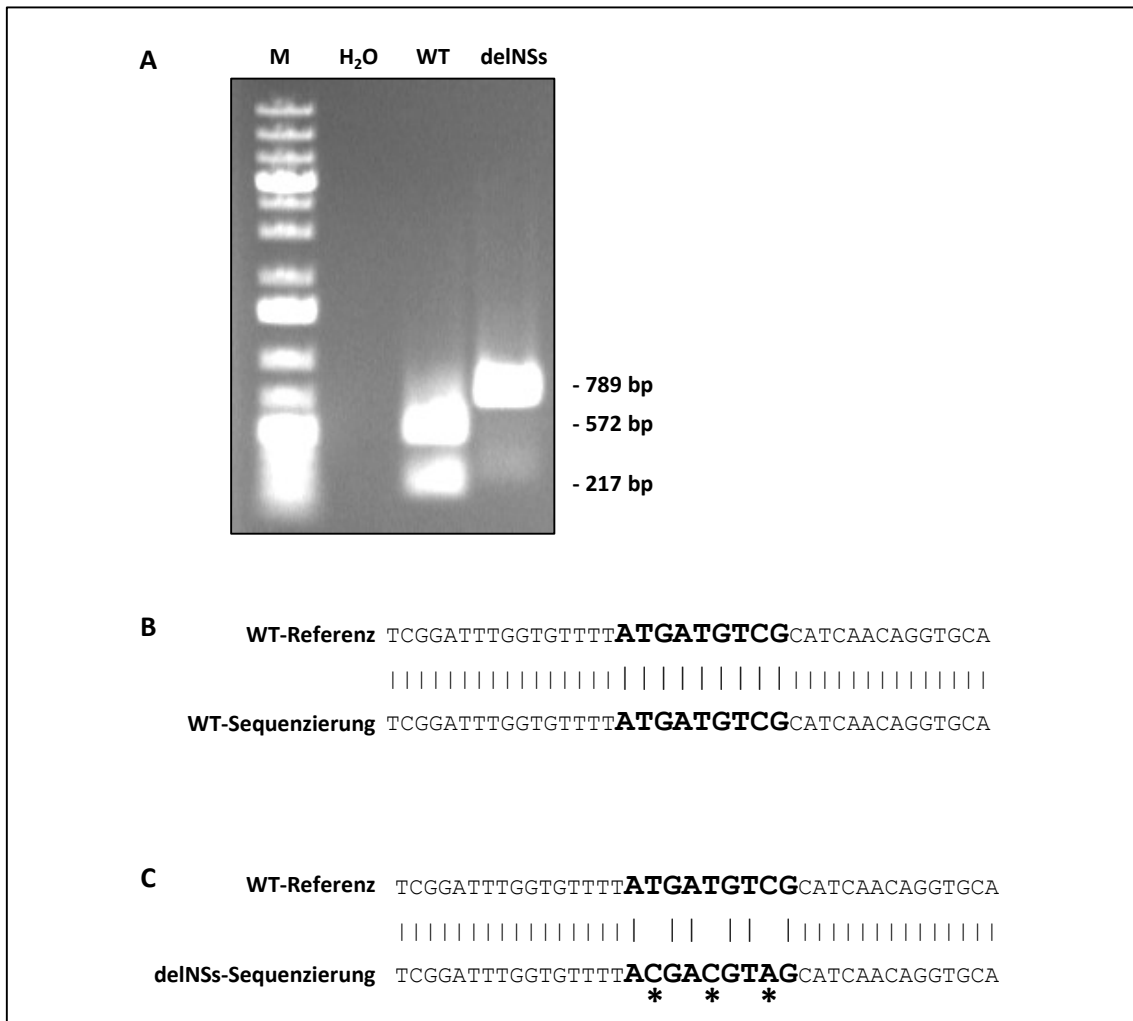


Abbildung 7.1: Virusverifizierung von LACV WT und rLACVdelNSs durch EcoRI-Enzymverdau und Sequenzierung
 MEF-STAT1^{-/-}-Zellen wurden mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 16 h p.i. (*post infection*) wurde aus dem Zellüberstand virale RNA extrahiert, einem DNaseI-Verdau unterzogen und mittels RT-PCR und LACV N-spezifischen Primern in DNA umgeschrieben und amplifiziert. Die amplifizierte DNA wurde einem EcoRI-Verdau unterzogen (**A**) und zur Sequenzierung mit LACV N-spezifischen Primern geschickt (**B** und **C**). Die Sequenzierung wurde durchgeführt für LACV WT (**B**) und für rLACVdelNSs (**C**) und mit der NCBI Referenz-Sequenz NC_004110.1 verglichen. Die Mutationen in der delNSs-Sequenz wurden mit einem Sternchen (*) markiert. M: Marker, H₂O: zur Kontrolle der RT-PCR; durchgeführt mit H₂O statt viraler RNA, bp: Basenpaare.

Abbildung 7.1 B und C zeigen die Sequenzierungsergebnisse beider Viren. Als Referenz wurde eine wildtypische Sequenz des kompletten S-Segments von LACV verwendet (NCBI Referenz-Sequenz NC_004110.1). Die Sequenzierung in Abbildung 7.1 B zeigt, dass LACV WT die ursprüngliche, wildtypische Sequenz enthält, die für das NSs-Gen kodiert. Die Sequenzierung in Abbildung 7.1 C zeigt, dass rLACVdelNSs die eingeführten Mutationen, die die ersten beiden Startcodons verändern (ACG, ACG) und das dritte Codon zu einem Stoppcodon (TAG) mutieren, enthält. Die

beiden Viren entsprechen also den vorher schon veröffentlichten Daten von Blakqori & Weber (2005) und wurden in dieser Arbeit für alle Experimente verwendet.

7.1.2 Verifizierung des Abbaus von Rpb1 durch LACV WT

Um zu analysieren, ob auch das wildtypische LACV WT die Rpb1-Untereinheit der RNAPII abbaut, wurden A549-Zellen (siehe 5.2.1) mit einer MOI von 5 mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert. 5 h p.i. (*post infection*) wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot (siehe 6.5.1 und 6.5.2) oder qRT-PCR (siehe 6.4.5) analysiert.

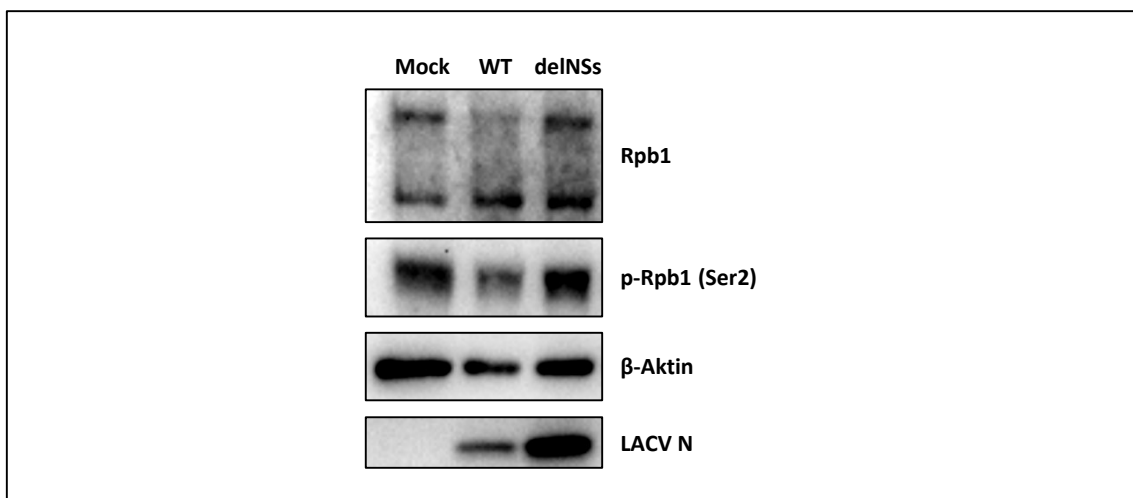


Abbildung 7.2: Rpb1-Abbau durch LACV WT

A549-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 5 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die Proteine wurden nach SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörpern gegen Rpb1, p-Rpb1 (Ser2), β -Aktin und LACV N analysiert.

In Abbildung 7.2 sind in der oberen Reihe die beiden Banden der Rpb1-Untereinheit, Ila und Ilo, in Mock- und rLACVdelNSs-infizierten Zellen zu erkennen. Man erkennt jedoch, dass durch eine LACV WT-Infektion die hyperphosphorylierte Bande der Rpb1-Untereinheit, welche die obere Bande der Doppelbande ist (Ilo), schwächer ist als die hyperphosphorylierte Bande in der Mock- oder in der rLACVdelNSs-infizierten Probe. Auch der phosphospezifische Antikörper, der an das phosphorylierte Serin2 (Ser2) der C-terminalen Domäne (CTD) der Rpb1-Untereinheit bindet (zweite Reihe), ist in LACV WT-infizierten Zellen schwächer als in Mock- oder rLACVdelNSs-infizierten Zellen.

Eine andere Möglichkeit, die Inhibition der RNAPII nachzuweisen, ist die Messung des γ -Aktin-Introns. Introns haben meistens eine kurze Halbwertszeit und die Messung der Introns ist deswegen eine gute Methode, die *de novo messenger* RNA (mRNA)-Synthese zu analysieren (Evans-

Molina *et al.*, 2007). Das γ -Aktin-Gen wurde gewählt, weil es in der Zelle stark und konstitutiv exprimiert wird (Cheng & Sharp, 2003).

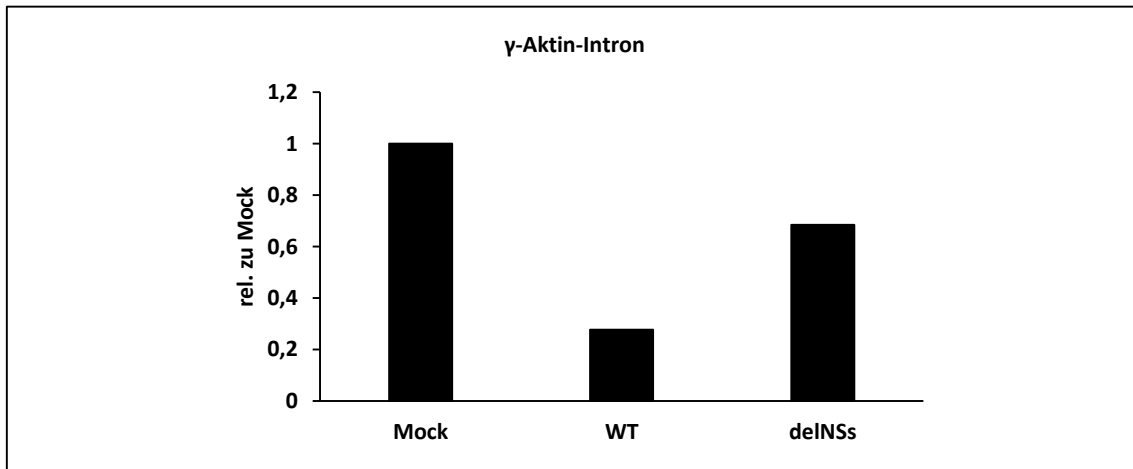


Abbildung 7.3: Reduktion der *de novo messenger* RNA-Synthese durch LACV WT

A549-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 5 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR mit Primern für γ -Aktin-Intron analysiert. Die Viruskontrolle (Primer für LACV N) befindet sich in Abbildung 7.4. Für die Normalisierung der Werte wurden Primer für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

In Abbildung 7.3 ist zu erkennen, dass durch eine LACV WT-Infektion die *de novo* mRNA-Synthese im Vergleich zu Mock-Zellen um circa 70 % reduziert ist.

Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse die Befunde, die mit rekombinantem LACV WT erzielt wurden (Verbruggen *et al.*, 2011).

7.1.3 Verifizierung der Interferon-Inhibition durch LACV WT

Um auch die Interferon (IFN)-Inhibition durch das wildtypische LACV WT zu analysieren, wurden A549-Zellen mit einer MOI von 5 mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert. 5 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR analysiert.

Abbildung 7.4 A zeigt, dass rLACVdelNSs wie erwartet sowohl IFN- β als auch ISG56 (Interferon-stimuliertes Gen 56, siehe 3.3.2) induziert, da es über keinen IFN-Antagonisten mehr verfügt. Im Gegensatz dazu wird sowohl in Mock- als auch in LACV WT-infizierten Zellen kein IFN- β und auch kein ISG56 induziert.

Trotz vergleichbar starker Virusreplikation (siehe Abbildung 7.4 B) gibt es also deutliche LACV-NSs-abhängige Unterschiede in der Induktion der antiviralen Abwehr.

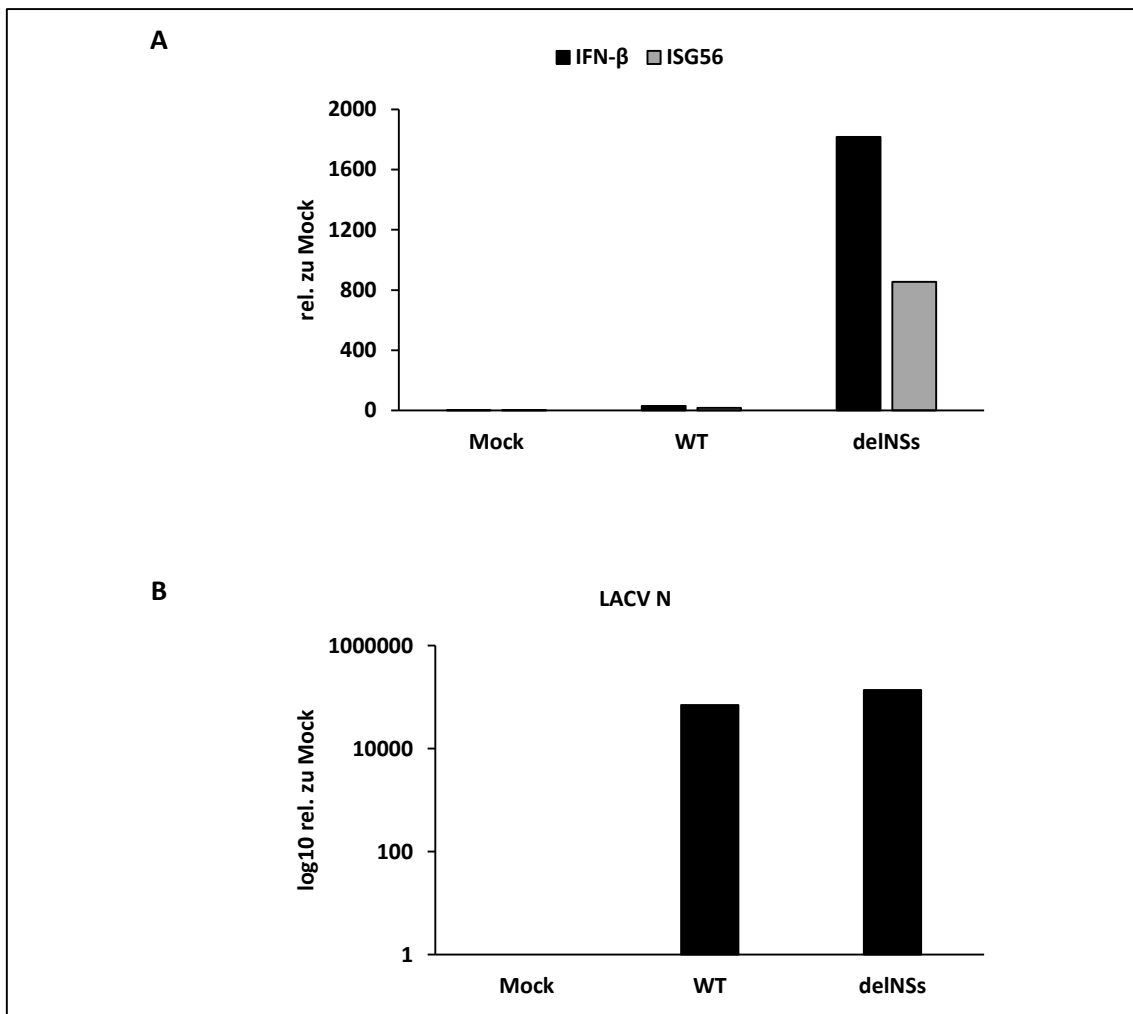


Abbildung 7.4: Interferon-Inhibition durch LACV WT

A549-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 5 h p.i. wurden die Zellen lysiert, die RNA extrahiert und mittels qRT-PCR mit Primern für IFN- β und ISG56 (A) und LACV N (B) analysiert. Für die Normalisierung der Werte wurde die mRNA der GAPDH gemessen.

7.1.4 Zeitverlauf des Rpb1-Abbaus durch LACV WT

Um den Rpb1-Abbau etwas näher zu charakterisieren, wurde ein Zeitverlauf der Infektion erstellt. Hierzu wurden A549-Zellen mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert und 2, 4, 6, 8, 18 und 24 h später lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

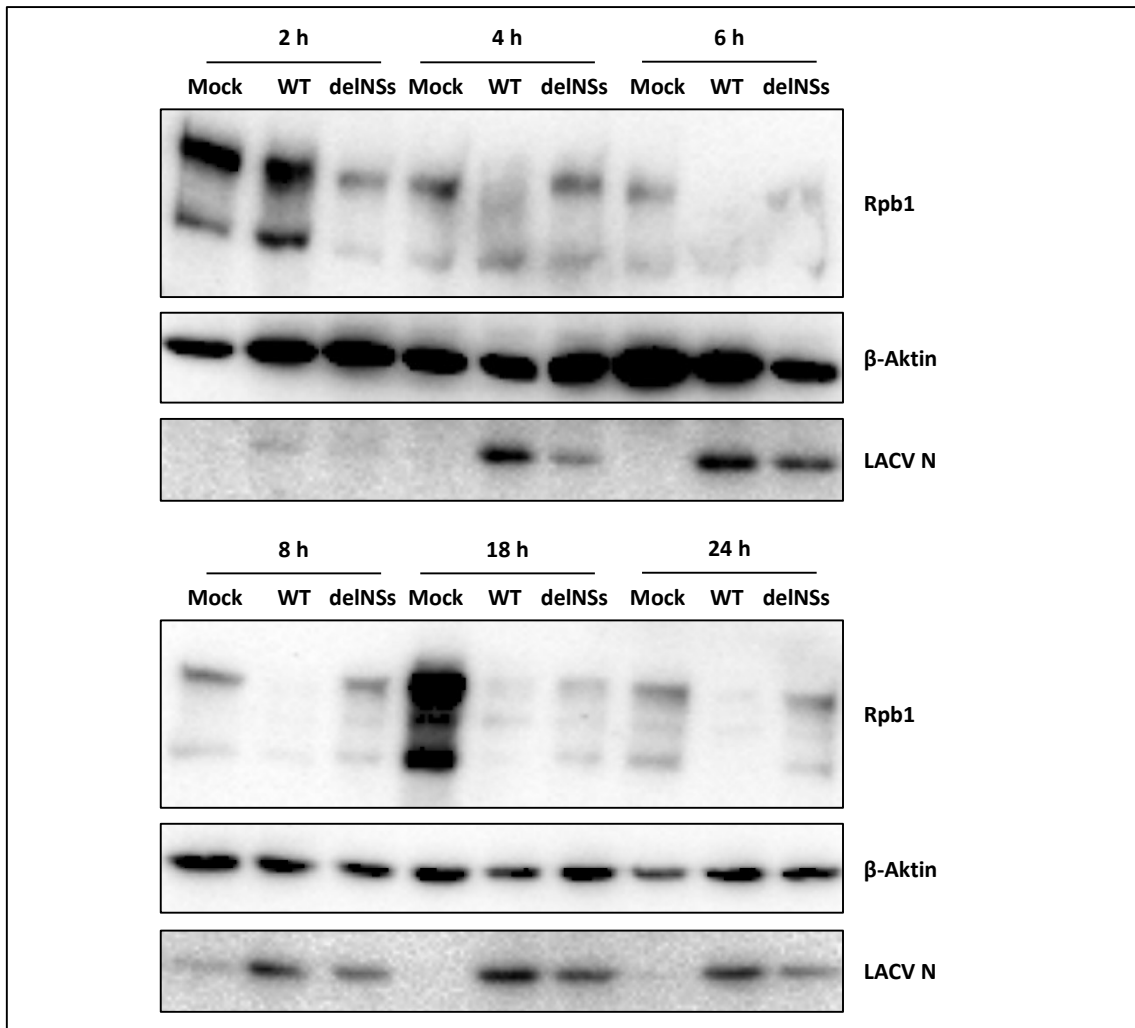


Abbildung 7.5: Zeitverlauf des Rpb1-Abbaus durch LACV WT

A549-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 2, 4, 6, 8, 18 und 24 h später wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen Rpb1, β -Aktin und LACV N analysiert.

Aus Abbildung 7.5 geht hervor, dass 2 h nach Infektion noch kein Abbau der Rpb1-Untereinheit stattfindet. Zu diesem Zeitpunkt ist kaum N-Protein gebildet worden. Nach 4 h kann man schon einen Abbau der hyperphosphorylierten Bande (Ilo) erkennen. Weiterhin wurde in den Zellen N-Protein hergestellt und es fällt auf, dass LACV WT schneller ist als rLACVdelNSs. Nach 6 h ist nicht nur die Ilo-Bande verschwunden, sondern auch die untere, hypophosphorylierte Ila-Bande. 6 h nach der Infektion ist die Rpb1-Untereinheit der RNAPII also vollständig abgebaut.

7.2 Einfluss von LACV auf das Ubiquitin-Proteasom-System

7.2.1 Inhibition des Rpb1-Abbaus durch einen Proteasom-Inhibitor

In Verbruggen *et al.* von 2011 wurde in Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt, dass der Abbau von Rpb1 von dem Proteasom abhängig ist, da MG132 – ein Proteasom-Inhibitor – diesen Abbau verhindert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Inhibition des Rpb1-Abbaus durch Gabe des Proteasom-Inhibitors mittels Western-Blot analysiert. Hierzu wurden A549-Zellen mit einer MOI von 5 mit LACV WT oder rLACVdeINSs für 3 h infiziert. Dann wurden die Zellen entweder mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach insgesamt 5 h wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

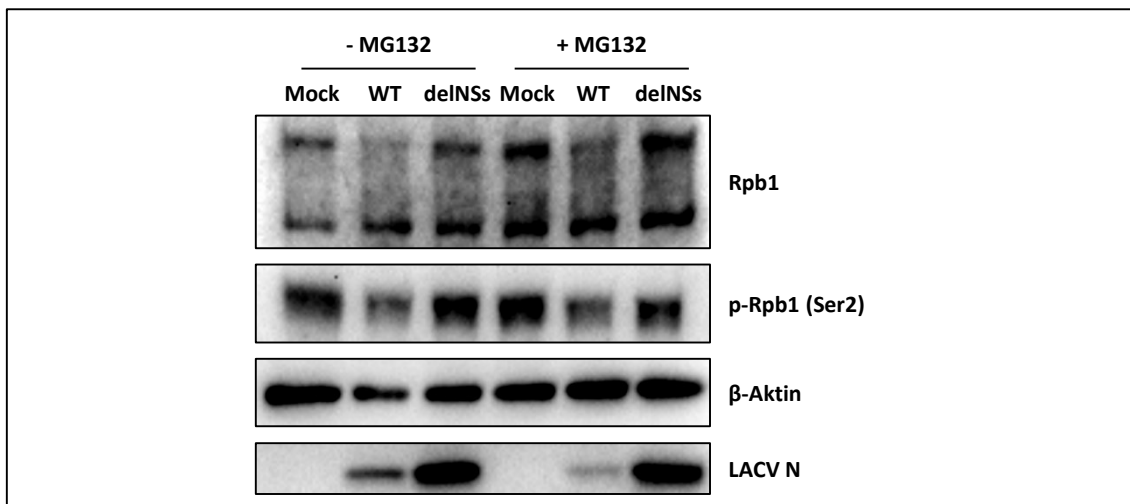


Abbildung 7.6: Inhibition des LACV-NSs induzierten Rpb1-Abbaus durch MG132

A549-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdeINSs (deINSs) infiziert. 3 h p.i. wurden die Zellen entweder mit 20 μ M MG132 behandelt oder unbehandelt gelassen. Insgesamt 5 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen Rpb1, p-Rpb1 (Ser2), β -Aktin und LACV N analysiert. Die unbehandelten Proben sind dieselben Proben wie aus Abbildung 7.2.

Aus Abbildung 7.6 ist zu erkennen, dass die Gabe des Proteasom-Inhibitors MG132 dazu führt, dass der Abbau von Rpb1 gehemmt wird. Es zeigt sich allerdings auch, dass besonders LACV WT in seiner Replikation vermindert zu sein scheint, wenn der Proteasom-Inhibitor hinzugegeben wird. Das ist auch von vorhergehenden Arbeiten bekannt (Verbruggen *et al.*, 2011) und auch das Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) leidet unter der Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor (persönliche Mitteilung, Markus Kainulainen). Aufgrund dessen erfolgte eine Infektion immer für mehrere Stunden mit anschließender Inhibitorbehandlung. Da dem Abbau von Proteinen durch

das Proteasom eine Ubiquitinylierung vorausgeht, lag es nahe, den Ubiquitin-Status von LACV-infizierten Zellen zu analysieren.

7.2.2 Analyse des Ubiquitin-Status in LACV-infizierten Zellen mittels Pulldown

Um den Ubiquitinylierungsstatus in LACV-infizierten Zellen zu untersuchen, wurden sogenannte TUBEs (*tandem ubiquitin binding entities*) verwendet (siehe Kapitel 6.7). Dafür wurden Huh7-Zellen (siehe 5.2.1) mit einer MOI von 10 mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert und 3 h p.i. mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Insgesamt 6,5 h p.i. wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert (siehe 5.9), einem Ubiquitin-Pulldown unterzogen (siehe 6.7) und dann mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Durch die Antikörperfärbung gegen Ubiquitin konnte in diesem Experiment der generelle Ubiquitinylierungsstatus analysiert werden.

In Abbildung 7.7 A sind in der Pulldown-Fraktion die ubiquitinylierten Proteine durch einen Ubiquitin-Antikörper angefärbt worden. Das Signal ist in Mock-Zellen nicht sehr stark und spiegelt die Menge an ubiquitinylierten Proteinen in der Zelle wieder, die normalerweise vorkommt. In LACV WT-infizierten Zellen sieht man jedoch, dass deutlich mehr ubiquitinylierte Proteine vorhanden sind als in Mock- oder rLACVdelNSs-infizierten Zellen. Die statistische Auswertung zeigt, dass die Ubiquitinylierung in LACV WT-infizierten Zellen im Vergleich zu Mock-Zellen signifikant erhöht ist (Abbildung 7.7 B). Das LACV-NSs-Protein scheint also die generelle Ubiquitinylierung in infizierten Zellen zu erhöhen.

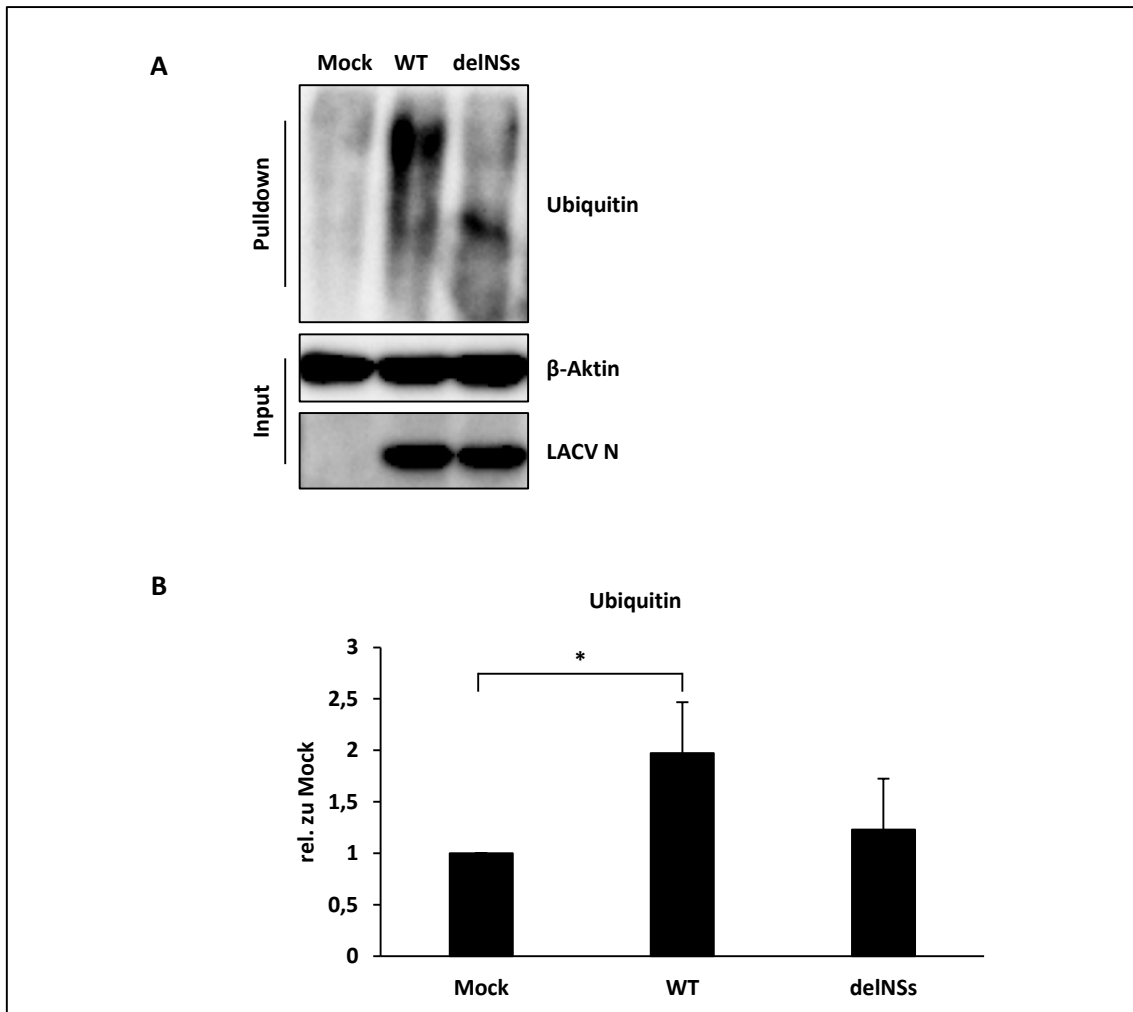


Abbildung 7.7: Analyse des Ubiquitin-Status in LACV-infizierten Zellen mittels Ubiquitin-Pulldown

A. Huh7-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 3 h p.i. wurden die Zellen mit 20 μ M MG132 behandelt. Insgesamt 6,5 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die ubiquitinylierten Proteine mittels TUBEs (*tandem ubiquitin binding entities*) angereichert. Nach SDS-PAGE und Western Blot konnten die angereicherten Proteine mittels Antikörper gegen Ubiquitin analysiert werden. Proteine der Input-Kontrolle wurden mit Antikörpern gegen β -Aktin und LACV N gefärbt. **B.** Quantifizierung des in **A.** gezeigten Ubiquitin-Signals aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

7.2.3 Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen

Proteine können in der Zelle über zwei verschiedene Wege abgebaut werden; zum einen über den proteasomalen Weg, zum anderen über den lysosomalen. Es ist bekannt, dass für den proteasomalen Abbau eine Ubiquitin-Verlinkung über Lysin48 (K48) nötig ist. Da aus Abbildung 7.7 hervorgeht, dass LACV WT eine generelle Ubiquitinylierung in infizierten Zellen induziert und Abbildung 7.6 zeigt, dass das Proteasom-System involviert ist, sollte untersucht werden, wie die Ubiquitinylierung verlinkt ist.

7.2.3.1 Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen mit Hilfe von U2OS-Ubiquitin-Zellen

Um die verschiedenartige Verlinkung von Ubiquitinketten aufzuschlüsseln, hat die Arbeitsgruppe von Zhijian J. Chen gentechnisch veränderte U2OS-Zellen hergestellt, in denen das Level von endogenem Ubiquitin mittels Knockdown vermindert wird und in denen gleichzeitig exogenes, mutiertes Ubiquitin induziert wird (Xu *et al.*, 2009). Dafür wurden U2OS-Zellen verwendet, in die ein Tetracyclin-induzierbares RNAi (RNA-Interferenz)-System eingebracht wurde, welches dazu diente, endogene Ubiquitinlevel zu vermindern. Weiterhin wurden Plasmide in diese Zellen eingebracht, die für exogene und mutierte Varianten von Ubiquitin kodieren, die gleichzeitig RNAi resistent sind (Xu *et al.*, 2009).

In humanen Zellen gibt es insgesamt vier Gene, die für Ubiquitin kodieren: UBA52, RPS27A, UBB und UBC. Diese werden durch zwei shRNAs, die jeweils komplementär zu UBA52 und UBC (sh-Ub1) beziehungsweise zu RPS27A und UBB (sh-Ub2) sind, in ihrer Expression gestört. Beide shRNAs befinden sich auf einem DNA-Plasmid, das vier Kopien von sh-Ub1 und sechs Kopien von sh-Ub2 trägt und das weiterhin für ein Puromycin-Resistenzgen kodiert. Die U2OS-Zellen tragen neben diesem Plasmid noch ein weiteres, das für mutiertes Ubiquitin kodiert: entweder ist das Lysin48 (K48) zu Arginin (K48R) oder das Lysin63 (K63) ist zu Arginin mutiert (K63R). Diese Konstrukte sind shRNA-resistent und tragen außerdem ein Neomycin-Resistenzgen, so dass Zellen, die diese Konstrukte enthalten, mit Hilfe von Geneticin selektiert werden können. Die Konstrukte für das mutierte Ubiquitin sind weiterhin mit einem HA-Tag versehen, was die Expressionsanalyse per Western-Blot vereinfacht (Xu *et al.*, 2009).

Um zunächst zu testen, ob die U2OS-Zellen sich so verhalten wie in Xu *et al.* von 2009 beschrieben, wurden die U2OS-Ubiquitin-Zellen für vier Tage mit Tetracyclin induziert oder unbehandelt gelassen und danach lysiert und analysiert.

Eine wie in Xu *et al.* 2009 beschriebene RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese funktionierte nicht (Daten nicht gezeigt), weswegen eine qRT-PCR durchgeführt wurde. Diese konnte erfolgreich für exogenes Ubiquitin, für UBB und RPS27A etabliert werden (siehe Abbildung 7.8 und siehe Anhang, Abbildung 0.1). Für die beiden anderen endogenen Ubiquitin-Gene konnte keine qRT-PCR etabliert werden, da die Schmelzkurven der verwendeten Primer keine eindeutige Schmelzkurve ergaben (siehe Anhang, Abbildung 0.1).

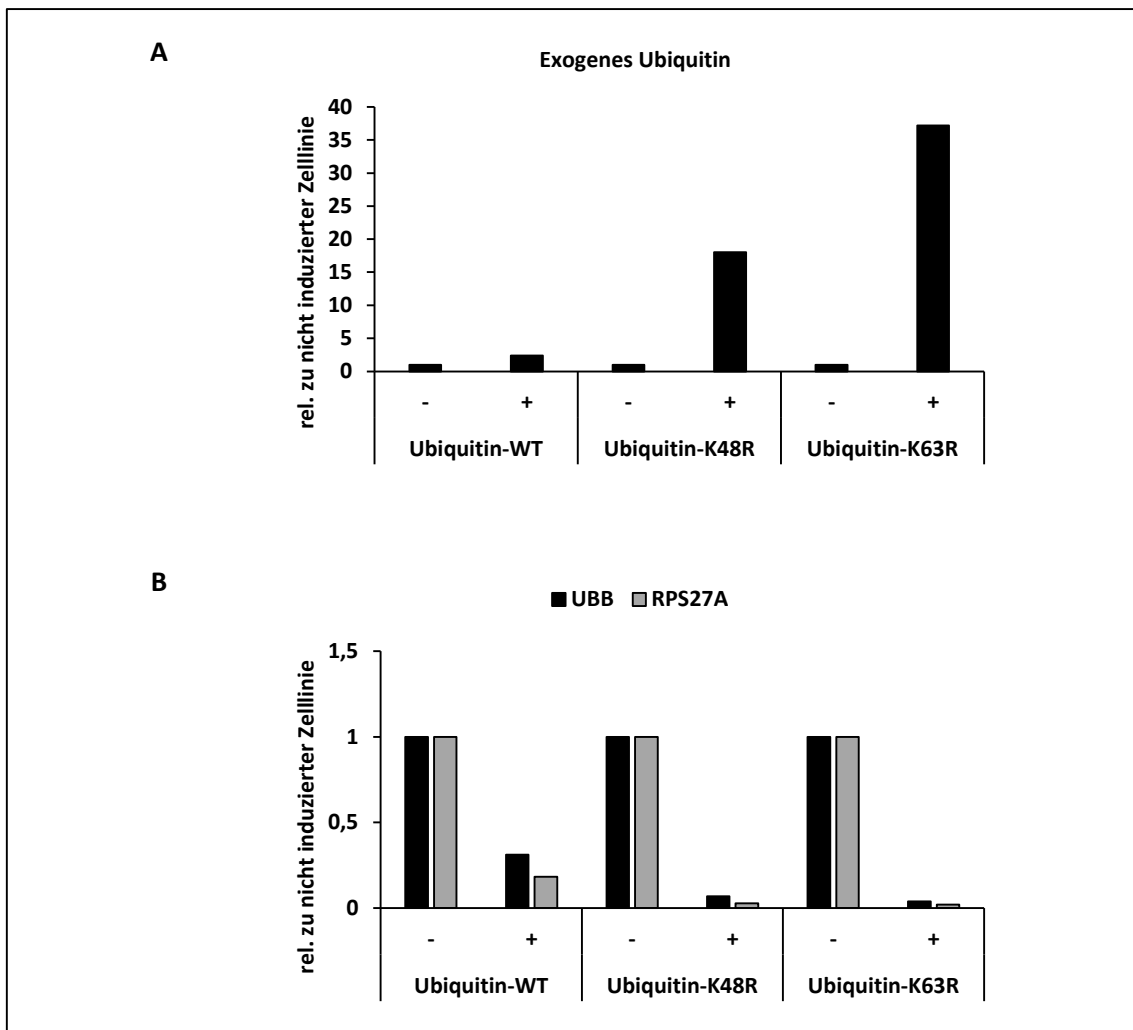


Abbildung 7.8: Induktion von U2OS-Ubiquitin-Zellen

U2OS-Ubiquitin-Zellen wurden für 4 Tage mit 1 µg/ml Tetracyclin induziert (+) oder unbehandelt gelassen (-), danach lysiert und mittels qRT-PCR und Primern für exogenes Ubiquitin (**A**) und UBB und RPS27A (**B**) analysiert. Zur Normalisierung wurden Primer für GAPDH verwendet. Ubiquitin-WT-Zellen enthalten sowohl das shRNA-Konstrukt, das zur Verminderung des endogenen Ubiquitins führt und ein Konstrukt, das für wildtypisches Ubiquitin, das jedoch shRNA-resistent ist, kodiert. Ubiquitin-K48R-Zellen enthalten ebenso das shRNA-Konstrukt und ein DNA-Plasmid, das für ein Ubiquitin kodiert, das in Lysin48 zu Arginin mutiert ist. In Ubiquitin-K63R-Zellen ist das Lysin63 zu Arginin mutiert.

In Abbildung 7.8 A wurde die mRNA des exogenen Ubiquitins in den verschiedenen Zelllinien gemessen. Ubiquitin-WT-Zellen, die das oben genannte shRNA-Konstrukt enthalten, welches zur Verminderung des endogenen Ubiquitin-Levels führt, enthalten außerdem noch ein DNA-Plasmid, das für exogenes, shRNA-resistentes, wildtypisches Ubiquitin kodiert. Ubiquitin-K48R-Zellen enthalten statt eines wildtypischen shRNA-resistenten Ubiquitins ein mutiertes Ubiquitin, das statt eines Lysins ein Arginin an Stelle 48 trägt. Die Ubiquitin-K63R-Zellen hingegen tragen ein DNA-Plasmid mit einem Ubiquitin, das an Stelle 63 eine Mutation von Lysin zu Arginin trägt. Wie man in Abbildung 7.8 A erkennen kann, wird in allen Zellen nach Induktion mit Tetracyclin exogenes Ubiquitin exprimiert. Hierbei ist der Effekt am stärksten in den Ubiquitin-K63R-Zellen,

in den Ubiquitin-K48R-Zellen ist er etwas schwächer ausgeprägt; nichtsdestotrotz ist die Expression um den Faktor 18 gesteigert. Induzierte Ubiquitin-WT-Zellen zeigen eine nur 2-fach erhöhte Expression des exogenen Ubiquitins.

In Abbildung 7.8 B wurde das endogene Ubiquitin mit Hilfe von Primern für UBB und RPS27A gemessen. Man sieht deutlich, dass in allen drei Zelllinien die Expression des endogenen Ubiquitins sinkt. Im Falle von RPS27A ist der Effekt etwas deutlicher als im Falle von UBB. Auch hier zeigen die Ubiquitin-K63R-Zellen die größte Verminderung des endogenen Ubiquitin-Levels, gefolgt von den Ubiquitin-K48R-Zellen. Dieser Effekt ist auch in den Ubiquitin-WT-Zellen zu erkennen, allerdings schwächer als bei den anderen beiden Zelllinien.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass die Induktion mit Tetracyclin schon nach drei Tagen erfolgreich in einer Verminderung der endogenen Ubiquitinlevel und einer Expression des exogenen Ubiquitins resultiert (Daten nicht gezeigt).

Nachdem gezeigt wurde, dass die U2OS-Ubiquitin-Zellen funktionieren, sollten sie verwendet werden, um den Einfluss der beiden Mutationen (K48R und K63R) auf eine LACV-Infektion zu untersuchen. Hierzu wurden diese Zellen wieder für drei Tage mit Tetracyclin behandelt oder unbehandelt gelassen, dann mit einer MOI von 5 mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert und 16 h p.i. lysiert und mittels qRT-PCR analysiert.

Wie auch in Abbildung 7.8 A ist auch in Abbildung 7.9 A ersichtlich, dass die Expression des exogenen Ubiquitins am stärksten in den Ubiquitin-K63R-Zellen ist. Nichtsdestotrotz erkennt man, dass auch in den Ubiquitin-WT-Zellen die Expression des exogenen Ubiquitins ungefähr 3-fach erhöht ist, in den Ubiquitin-K48R-Zellen 4-fach.

Abbildung 7.9 B zeigt, dass in allen drei Zelllinien das endogene Ubiquitin, repräsentiert durch die Messung von UBB und RPS27A, nach Induktion mit Tetracyclin herunterreguliert wird.

In Abbildung 7.9 C wurde die mRNA des N-Gens von LACV gemessen. Eine Induktion von wildtypischem Ubiquitin hat keinerlei Einfluss auf die Virusreplikation. Allerdings ist zu erkennen, dass rLACVdelNSs auch nach 16 h noch langsamer wächst als LACV WT. Eine Mutation des Lysin48 zu Arginin führt allerdings dazu, dass beide Viren, egal ob WT oder delNSs, nicht replizieren können. Denselben Effekt sieht man bei einer Mutation von Lysin63 zu Arginin. Da beide Verlinkungstypen extrem wichtig für den Proteinhaushalt der Zelle sind und sowohl den proteasomalen Abbau als auch andere Prozesse wie den Transport von Proteinen oder die DNA-Reparatur beeinflussen, kann eine Störung dieses Haushalts zu erheblichen Beeinträchtigungen in der Zelle führen. Aufgrund der gestörten Replikation beider Viren in den Zellen mit mutiertem Ubiquitin, kann man davon ausgehen, dass LACV von einem korrekten Ubiquitin-Haushalt abhängt.

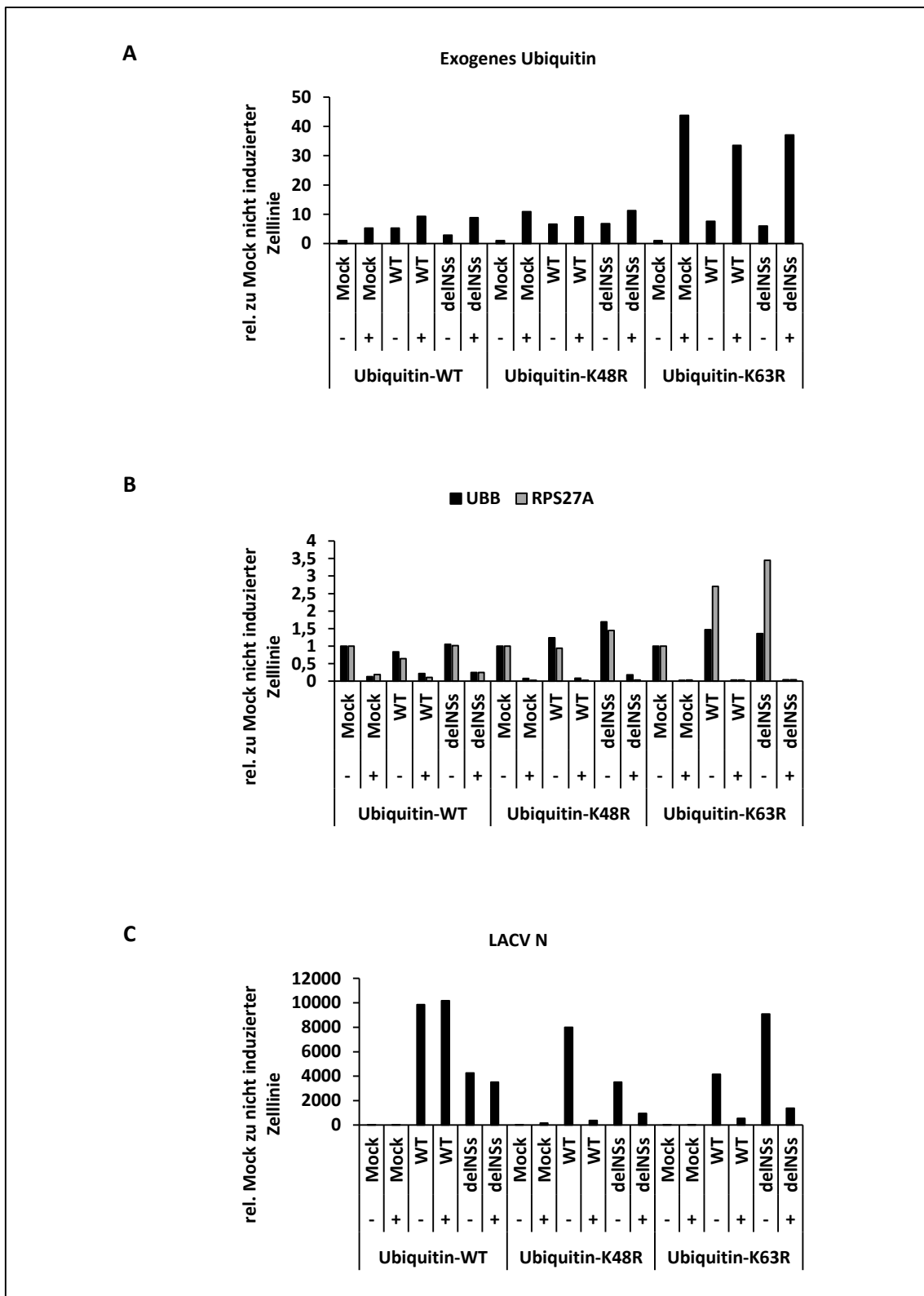


Abbildung 7.9: Infektion von U2OS-Ubiquitin-Zellen und Analyse mittels qRT-PCR

U2OS-Ubiquitin-Zellen wurden für 3 Tage mit 1 µg/ml Tetracyclin induziert (+) oder unbehandelt gelassen (-), dann mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdeINSs (deINSs) infiziert und 16 h p.i. lysiert. Die Proben wurden mittels qRT-PCR und Primern für exogenes Ubiquitin (A), UBB und RPS27A (B) und LACV N (C) analysiert. Zur Normalisierung wurden Primer für GAPDH verwendet.

In demselben Experiment wurde mittels qRT-PCR auch die Inhibition der ISG56 (IFN-stimuliertes Gen 56)-Induktion analysiert.

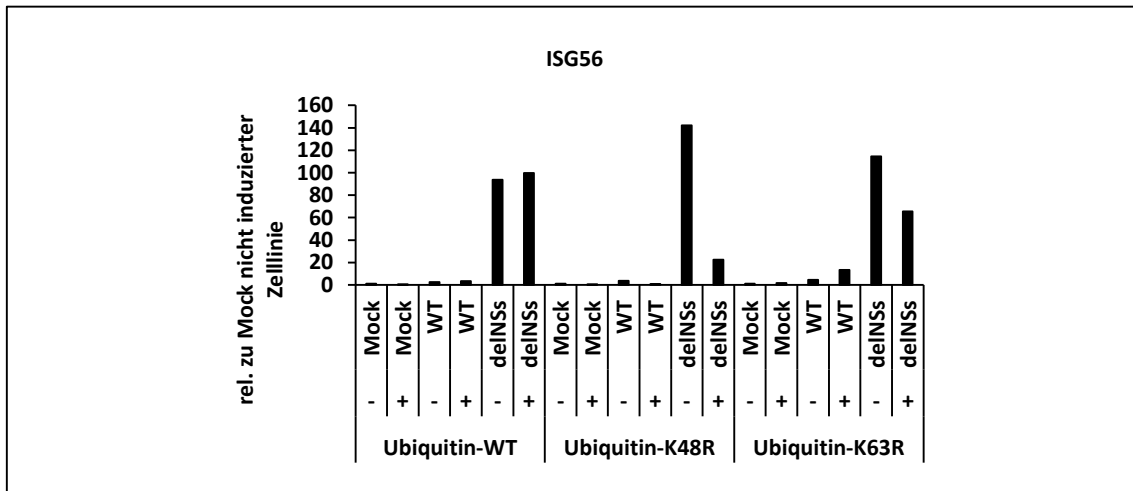


Abbildung 7.10: Analyse der ISG56-Induktion in LACV-infizierten U2OS-Ubiquitin-Zellen

Die Proben sind dieselben wie aus Abbildung 7.9; hier wurde die mRNA von ISG56 gemessen.

Wie erwartet inhibiert LACV WT in Ubiquitin-WT-Zellen die IFN-Antwort und somit die ISG56-Induktion (siehe Abbildung 7.10). Im Gegensatz dazu induziert rLACVdelNSs diese. Allerdings erkennt man auch hier deutlich, dass die Überexpression von mutiertem Ubiquitin zu keiner beziehungsweise nur zu einer geringen ISG56-Induktion führt. Das kann zum einen daran liegen, dass die Replikation von rLACVdelNSs vermindert ist oder gestört wird (siehe Abbildung 7.9 C), zum anderen kann es auch daran liegen, dass für eine Induktion von ISGs das Ubiquitin-Proteasom-System notwendig ist (siehe Kapitel 3.3.1).

Um die Beobachtung zu bestätigen, dass U2OS-Ubiquitin-Zellen, die mutiertes Ubiquitin überexprimieren, nicht mit LACV infizierbar sind, wurden SDS-PAGE- und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden wieder U2OS-Ubiquitin-Zellen für drei Tage mit Tetracyclin induziert oder unbehandelt gelassen und dann mit einer MOI von 10 mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert und analysiert.

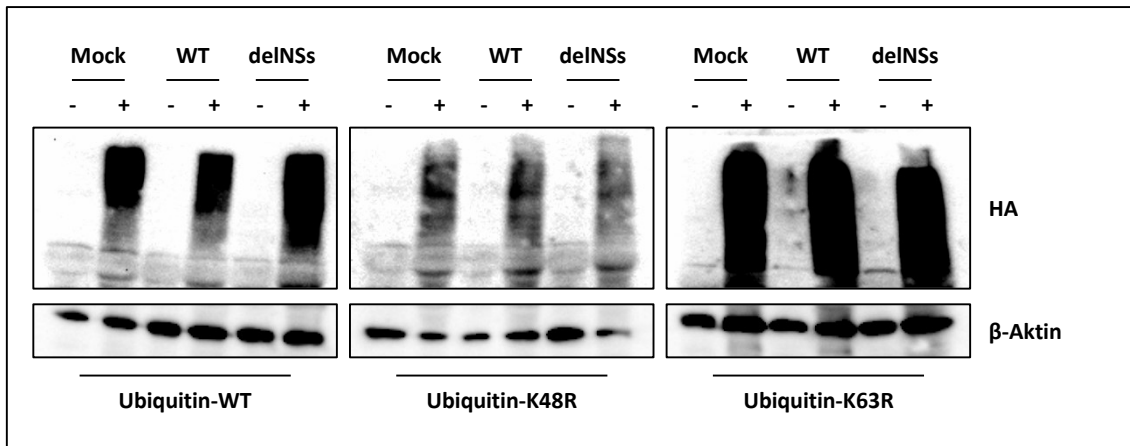


Abbildung 7.11: Infektion von U2OS-Ubiquitin-Zellen und Analyse mittels Western-Blot

U2OS-Ubiquitin-Zellen wurden für 3 Tage mit 1 µg/ml Tetracyclin induziert (+) oder unbehandelt gelassen (-), dann mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert und 16 h p.i. lysiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurden die Proben mit einem Antikörper gegen HA, der exogenes Ubiquitin detektiert, und mit einem Antikörper gegen β-Aktin analysiert.

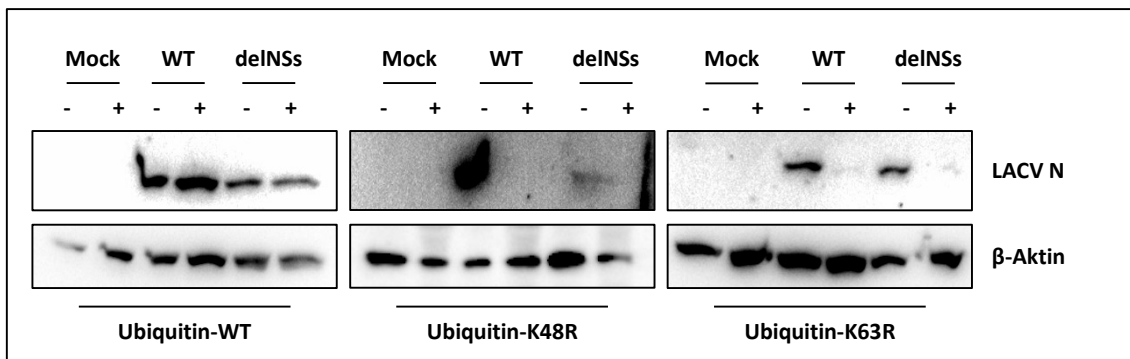


Abbildung 7.12: Analyse der LACV-Replikation in U2OS-Ubiquitin-Zellen

Die Proben wurden wie in Abbildung 7.11 vorbereitet und nach SDS-PAGE und Western-Blot mit einem Antikörper gegen LACV N und einem gegen β-Aktin gefärbt.

Abbildung 7.11 bestätigt die Ergebnisse aus Abbildung 7.8 A und Abbildung 7.9 A. Nach der Induktion mit Tetracyclin wird exogenes Ubiquitin, das mit einem HA-Tag versehen ist, überexprimiert und wird im Western-Blot mittels eines HA-Antikörpers sichtbar. Auch hier ist die Expression des exogenen K63R-Ubiquitins am stärksten.

In Abbildung 7.12 erkennt man, wie auch in der qRT-PCR, dass weder LACV WT noch rLACVdelNSs die U2OS-Ubiquitin-Zellen infizieren kann, die mutiertes Ubiquitin überexprimieren, während induzierte U2OS-Ubiquitin-WT-Zellen infizierbar sind.

7.2.3.2 Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen mit Hilfe von Ubiquitin-Verlinkungs-spezifischen Antikörpern

Da sich herausgestellt hat, dass Zellen, in denen mutiertes Ubiquitin gegen endogenes Ubiquitin ausgetauscht wurde, nicht mit LACV infizierbar sind, musste eine andere Methode angewandt werden, um die Verlinkung der induzierten Ubiquitinylierung (siehe 7.2.2) zu analysieren. Aufgrund dessen wurden Antikörper verwendet, die spezifisch Ubiquitin, das über Lysin48, oder Ubiquitin, das über Lysin63 verlinkt ist, erkennen.

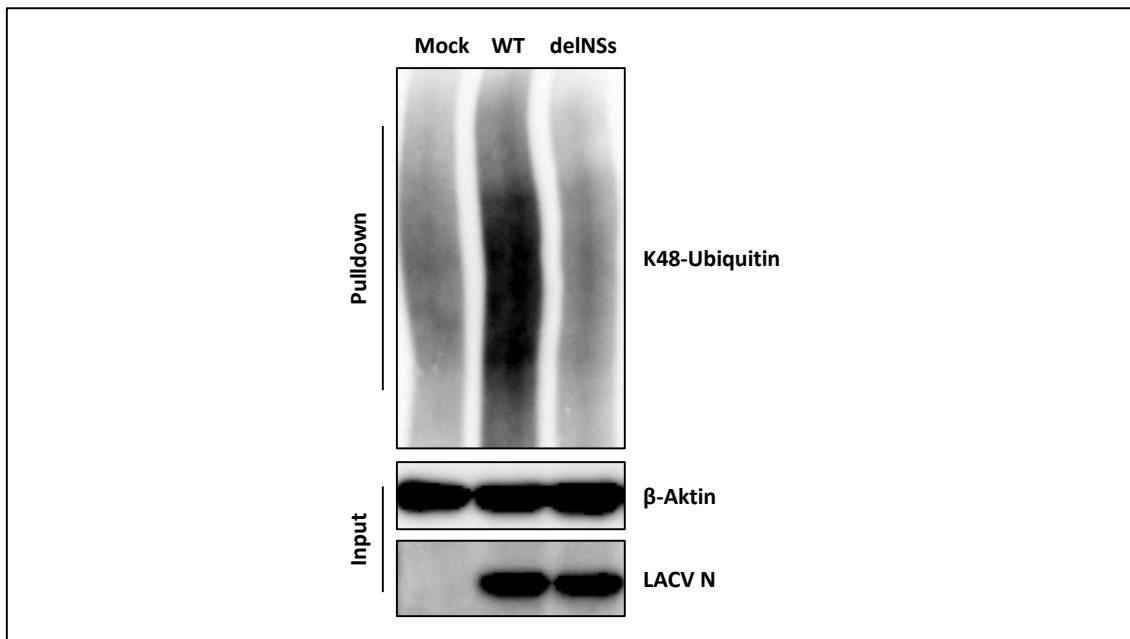


Abbildung 7.13: Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen mittels Ubiquitin-Pulldown

Huh7-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 3 h p.i. wurden die Zellen mit 20 μ M MG132 behandelt. Insgesamt 6,5 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die ubiquitinylierten Proteine mittels TUBEs (*tandem ubiquitin binding entities*) angereichert. Nach SDS-PAGE und Western Blot konnten die angereicherten Proteine mittels Antikörper gegen Ubiquitin-K48 analysiert werden. Hierfür wurden die Proben aus Abbildung 7.7 verwendet.

In Abbildung 7.13 erkennt man eindeutig, dass die durch den Ubiquitin-Pulldown angereicherten Proteine in LACV WT-infizierten Zellen K48-verlinkt sind. Auch in Mock- und rLACVdelNSs-infizierten Zellen erkennt man ein Signal für K48-verlinktes Ubiquitin. Da circa 50 % der ubiquitinylierten Proteine in der Zelle über K48 verlinkt sind (Heride *et al.*, 2014), werden durch den Ubiquitin-Pulldown auch in diesen beiden Proben Ubiquitin-K48-verlinkte Proteine angereichert, jedoch nicht in dem Maße, wie es in LACV WT-infizierten Zellen der Fall ist.

Da nach einem Ubiquitin-Pulldown nur eine geringe Probenmenge vorhanden war, und diese für die Analyse, ob Rpb1 direkt ubiquitinyliert wird, verwendet werden sollte, wurde zunächst getestet, ob die durch LACV WT induzierte generelle Ubiquitinylierung auch ohne TUBEs-Pulldown nachzuweisen ist. Hierfür wurden HeLa-Zellen (siehe 5.2.1) mit einer MOI von 10 mit LACV

WT oder rLACVdelNSs infiziert und 3,5 h p.i. mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Weitere 3 h danach wurden Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

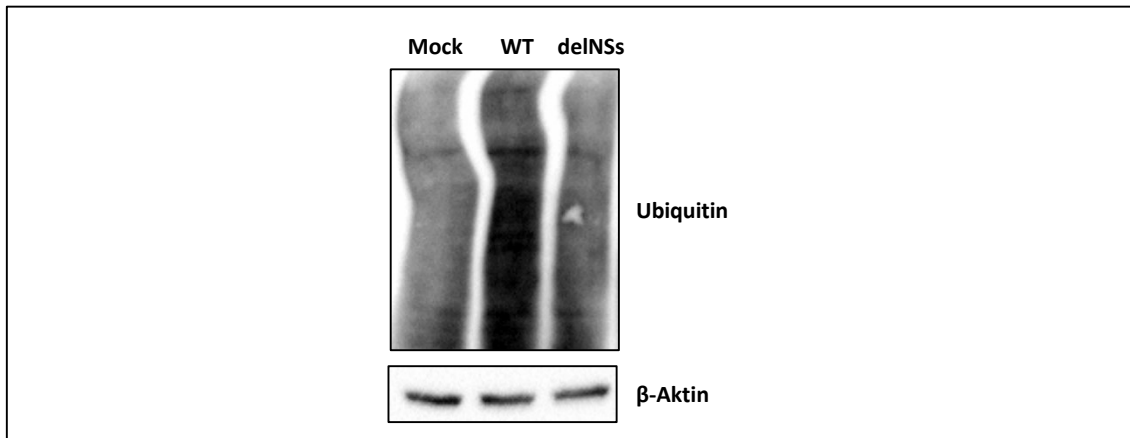


Abbildung 7.14: Analyse des Ubiquitin-Status in LACV-infizierten Zellen ohne Ubiquitin-Pulldown

HeLa-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 3,5 h p.i. wurden die Zellen mit 20 μ M MG132 behandelt. Insgesamt 6 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen Ubiquitin und β -Aktin analysiert.

Aus Abbildung 7.14 wird ersichtlich, dass auch ohne Anreicherung durch TUBEs ubiquitinylierte Proteine in den Zellen nachgewiesen werden können. Wie zu erwarten, findet man in Mock- und rLACVdelNSs-infizierten Zellen ubiquitinylierte Proteine. In LACV WT-infizierten Zellen hingegen ist die Ubiquitinylierung sehr viel stärker als in den beiden anderen Proben. Zusammen mit den Ubiquitin-Pulldown-Experimenten legt dies nahe, dass das LACV-NSs-Protein eine generelle Ubiquitinylierung induziert.

Da in Abbildung 7.14 gezeigt wurde, dass eine generelle Ubiquitinylierung auch ohne Pulldown nachgewiesen werden kann, sollte dieser Versuchsaufbau dazu dienen, die Verlinkung der Ubiquitinylierung zu klären. Hierfür wurde derselbe Versuchsansatz wie für Abbildung 7.14 verwendet, mit dem Unterschied, dass statt eines Antikörpers, der generelles Ubiquitin erkennt, ein Antikörper verwendet wurde, der entweder Lysin48 (K48)- oder Lysin63 (K63)-verlinktes Ubiquitin erkennt.

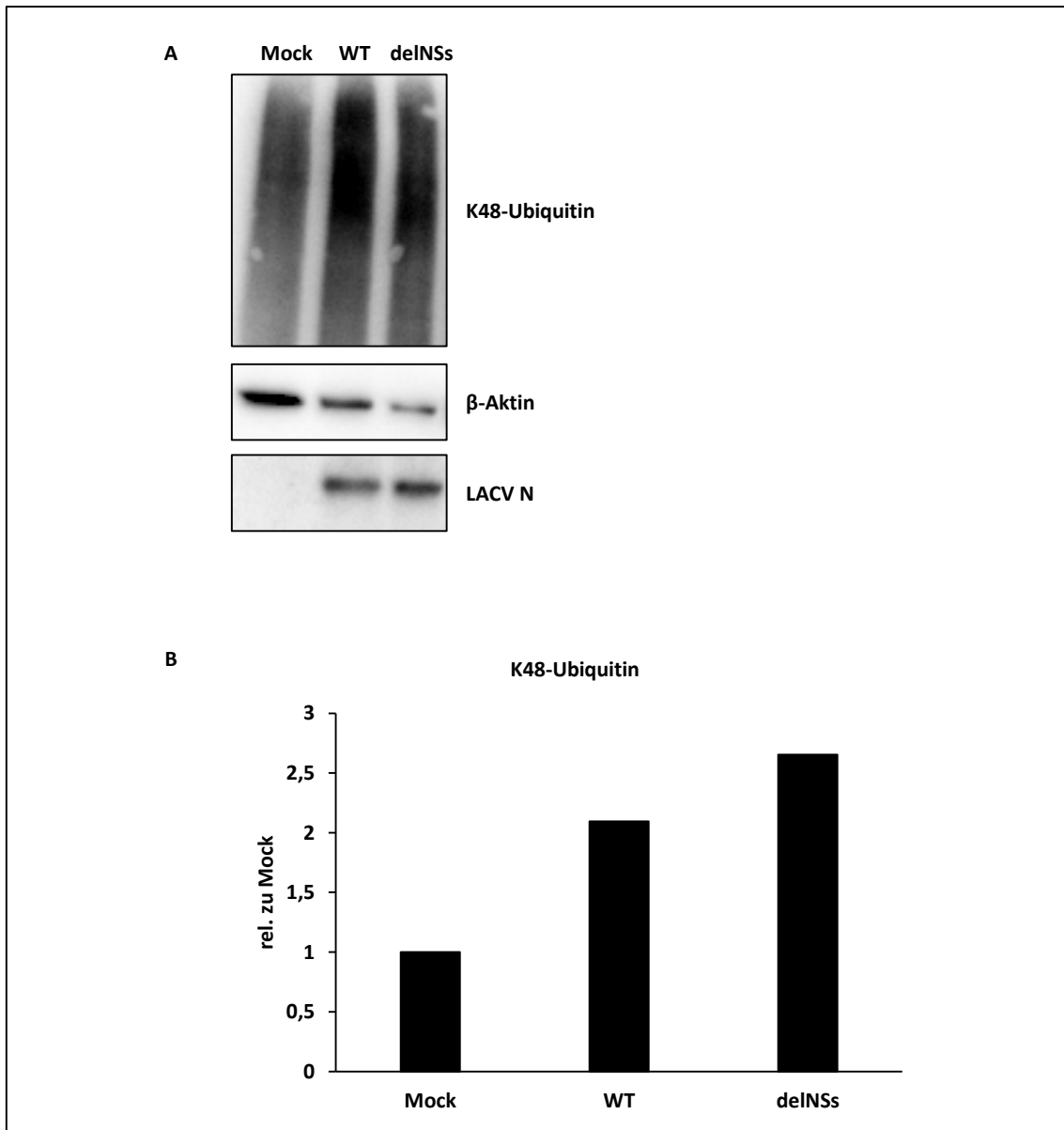


Abbildung 7.15: Analyse der Ubiquitin-K48-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen ohne Ubiquitin-Pulldown

A. HeLa-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 3 h p.i. wurden die Zellen mit 20 μ M MG132 behandelt. Insgesamt 6 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen K48-Ubiquitin, β -Aktin und LACV N analysiert. **B.** Quantifizierung des in **A.** gezeigten K48-Ubiquitin-Signals, normalisiert auf das β -Aktin-Signal.

In Abbildung 7.15 ist die Verlinkung von Ubiquitin mittels eines K48-Ubiquitin-spezifischen Antikörpers dargestellt, in Abbildung 7.16 die Ubiquitin-K63-Verlinkung. Es fällt auf, dass das Signal für Ubiquitin-K48 generell stärker ist als für Ubiquitin-K63. Das könnte daran liegen, dass die Verlinkung von Ubiquitin über K48 knapp 50 % der Ubiquitin-Verlinkungen ausmacht (Heride *et al.*, 2014). Weiterhin fällt auf, dass sich das Signal für K63-Ubiquitin in den verschiedenen Proben kaum unterscheidet. Im Gegensatz zur der Induktion der generellen Ubiquitinylierung durch LACV-NSs sieht man bei der K63-Ubiquitinylierung kaum eine Induktion (Faktor 1,2). Jedoch wird

die K48-Ubiquitylierung von LACV WT im Vergleich zu Mock-Zellen um das Doppelte induziert. Es scheint also, dass die Ubiquitylierung, die in LACV WT-infizierten Zellen induziert wird, dem K48-Verlinkungstyp entspricht. Man sieht auch eine Induktion der K48-Ubiquitin-Verlinkung in rLACVdelNSs-infizierten Zellen. Dies könnte zum Beispiel daran liegen, dass für die IFN-Induktion Effektorproteine über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden, damit andere Effektorproteine aktiviert werden können (siehe 3.3.1).

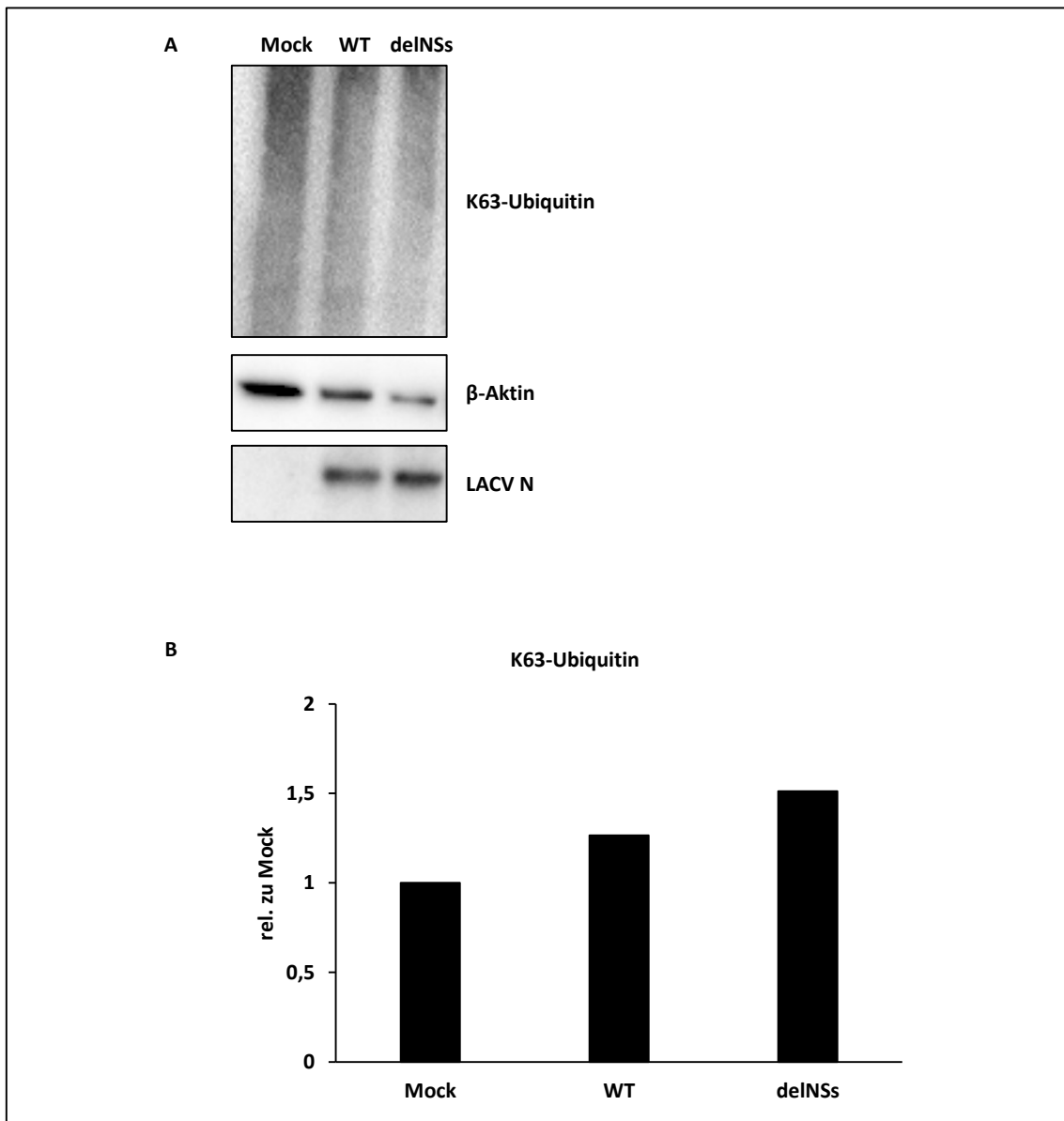


Abbildung 7.16: Analyse der Ubiquitin-K63-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen ohne Ubiquitin-Pulldown
A. Dieselben Proben wie aus Abbildung 7.15 wurden hier mit einem K63-Ubiquitin-Antikörper analysiert. **B.** Quantifizierung des in **A.** gezeigten K63-Ubiquitin-Signals, normalisiert auf das β-Aktin-Signal.

7.2.4 Analyse der Ubiquitinylierung von Rpb1 in LACV-infizierten Zellen

Nachdem zum einen gezeigt worden ist, dass das LACV-NSs-Protein die generelle Ubiquitinylierung in infizierten Zellen erhöht und dass zum anderen diese Ubiquitinylierung Lysin48 verlinkt ist, sollte untersucht werden, ob die Rpb1-Untereinheit selber auch ubiquitinyliert wird, da diese letztendlich während einer Infektion abgebaut wird. Hierzu wurden Huh7-Zellen mit einer MOI von 10 mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert und 3 h p.i. mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Insgesamt 6,5 h p.i. wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und einem Ubiquitin-Pulldown mittels TUBEs unterzogen. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE und Western-Blot hinsichtlich eines Pulldowns von Rpb1 analysiert.

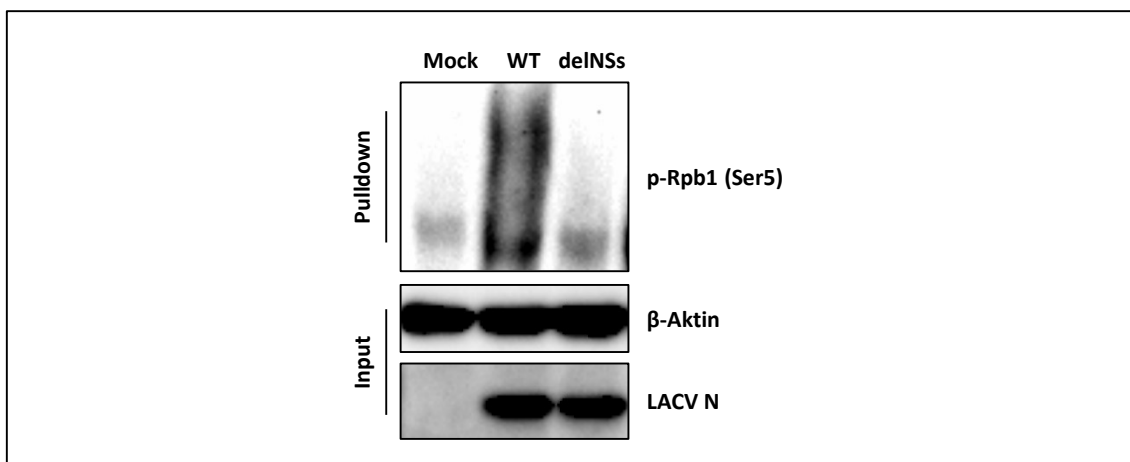


Abbildung 7.17: Analyse der Ubiquitinylierung von Rpb1 in LACV-infizierten Zellen mittels Ubiquitin-Pulldown

Proben aus Abbildung 7.7 wurden hier auf p-Rpb1 (Ser5) untersucht. Huh7-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 3 h p.i. wurden die Zellen mit 20 μ M MG132 behandelt. Insgesamt 6,5 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die ubiquitinylierten Proteine mittels TUBEs (*tandem ubiquitin binding entities*) angereichert. Nach SDS-PAGE und Western Blot konnte die ubiquitinylierte Rpb1-Untereinheit der RNAPII mit Hilfe eines Antikörpers gegen das phosphorylierte Serin5 (Ser5) analysiert werden. Zur Kontrolle wurden die Proteine mit Antikörpern gegen β -Aktin und LACV N gefärbt.

Um zu testen, ob die Rpb1-Untereinheit ubiquitinyliert wird, wurde ein Pulldown mit den in Kapitel 6.7 beschriebenen TUBEs durchgeführt. Das hatte den Vorteil, dass, falls Rpb1 tatsächlich ubiquitinyliert sein sollte, dieses vor einem Abbau durch das Proteasom geschützt wird. Wie aus Abbildung 7.17 ersichtlich, wird Rpb1 in Mock- oder in rLACVdelNSs-infizierten Zellen nicht ubiquitinyliert, da es durch einen Pulldown nicht akkumuliert wurde. In LACV WT-infizierten Zellen jedoch sieht man deutlich, dass durch einen Pulldown ubiquitinyliertes Rpb1 angereichert werden konnte. Um die Untereinheit gut sichtbar zu machen, wurde ein Antikörper benutzt, der an das phosphorylierte Ser5 der CTD bindet, da dieses in großem Maße vorhanden ist.

Aus den Ubiquitinylierungsstudien kann zusammengefasst werden, dass das LACV-NSs-Protein i) eine generelle Ubiquitinylierung in Zellen induziert, ii), dass diese Ubiquitinylierung Lysin48 verlinkt ist und iii) dass die Rpb1-Untereinheit ubiquitinyliert wird.

7.3 Einfluss der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 in einer LACV-Infektion

7.3.1 Analyse des Einflusses von Nedd4 in LACV-infizierten Zellen mittels siRNA

Da in Kapitel 7.2 gezeigt wurde, dass das Ubiquitin-Proteasom-System in dem Abbau von Rpb1 durch das LACV-NSs-Protein eine Rolle spielt, sollte nun nach den verantwortlichen Ubiquitin-E3-Ligasen gesucht werden. Der Abbau der Rpb1-Untereinheit der RNAPII durch das NSs-Protein von LACV zeigt große Ähnlichkeiten zu der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR). Hierbei wird die Rpb1-Untereinheit nach einem irreparablen DNA-Schaden durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut, wobei zwei Ubiquitin-E3-Ligasen für die Ubiquitinylierung verantwortlich sind. Wie in Harreman *et al.* von 2009 beschrieben, kooperiert die Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) mit einem Elongin A/B/C-Cullin 5-Komplex um Rpb1 zu ubiquitinylieren und dem Abbau zuzuführen (siehe Kapitel 3.6.1). In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Nedd4 auch in den durch LACV-NSs-vermittelten Abbau von Rpb1 involviert ist. Hierzu wurde das Nedd4-Level in HeLa-Zellen via siRNA vermindert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit siRNA gegen Nedd4 transfiziert. Danach wurden die Zellen mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert und 16 h p.i. lysiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

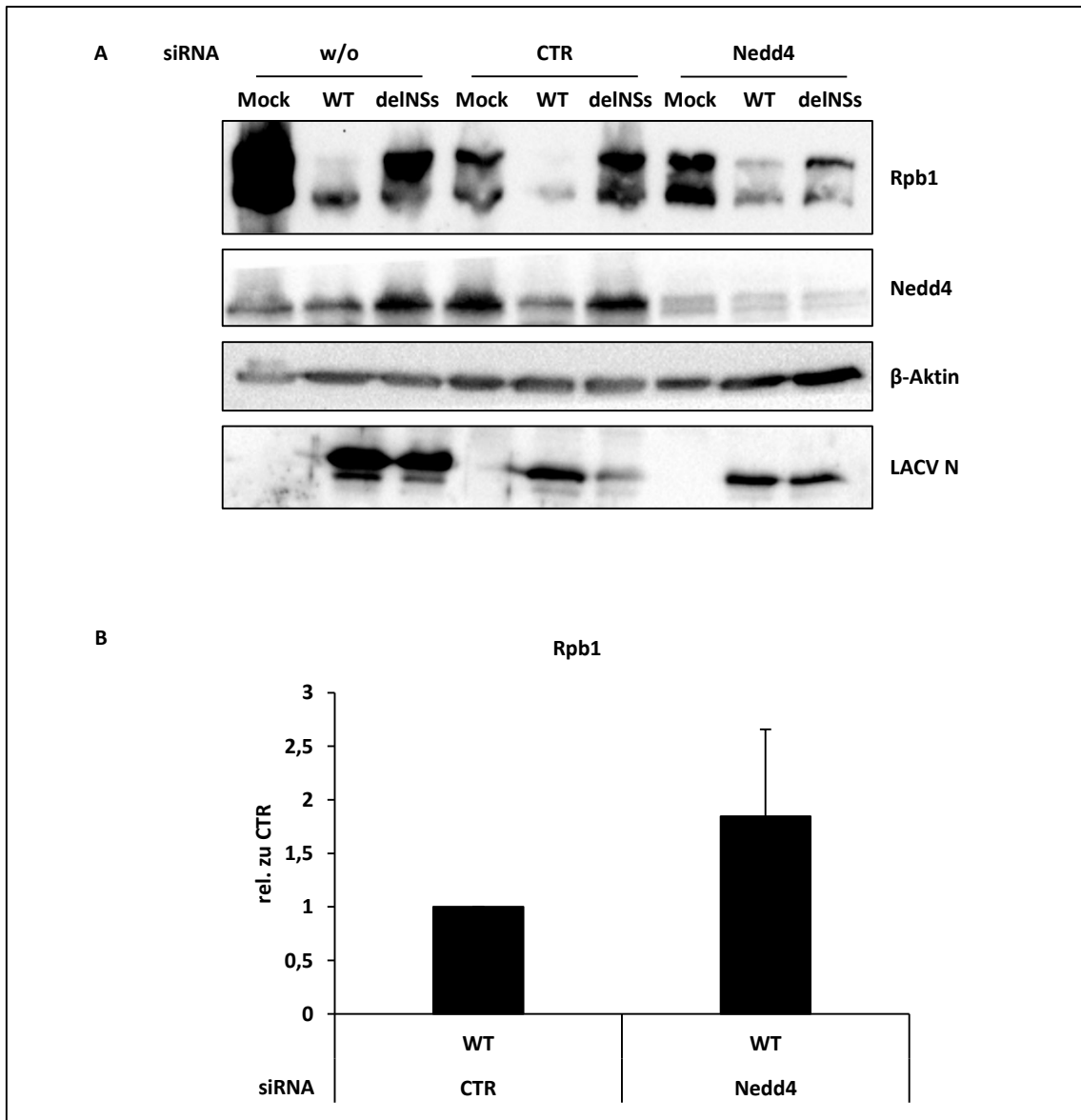


Abbildung 7.18: Effekt eines Nedd4-Knockdowns auf den Rpb1-Abbau durch LACV WT

A. HeLa-Zellen wurden mit 50 nM siRNA transfiziert (CTR/Nedd4) oder unbehandelt gelassen (w/o) und für 48 h inkubiert. Dann wurde die Transfektion wiederholt und 24 h p. t. (*post transfection*) wurden die Zellen entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert und für 16 h inkubiert. Dann wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen Rpb1, Nedd4, β-Aktin und LACV N analysiert. w/o: *without*, CTR: Kontroll-siRNA. **B.** Quantifizierung des in **A.** gezeigten Rpb1-Signals in Zellen, die mit Kontroll-siRNA oder Nedd4-siRNA behandelt wurden und mit LACV WT infiziert wurden. Normalisierung zu dem LACV N-Signal. Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 7.18 A wurden HeLa-Zellen entweder nicht behandelt (w/o), mit einer Kontroll-siRNA behandelt (CTR) oder mit einer siRNA gegen Nedd4 behandelt. Wie man in der Antikörperfärbung gegen Nedd4 erkennen kann, induziert die Transfektion mit der Nedd4-siRNA einen Knockdown des Proteins, wohingegen das Nedd4-Level in unbehandelten Zellen oder in CTR-siRNA behandelten Zellen gleich bleibt. In unbehandelten und Kontroll-siRNA-behandelten Zellen führt die Infektion mit LACV WT zu einem Abbau der Rpb1-Untereinheit der RNAPII; deutlich

an der verschwundenen oberen (hyperphosphorylierten) llo-Bande zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind sowohl in Mock-Zellen als auch in rLACVdelNSs-infizierten Zellen beide Banden von Rpb1 zu erkennen. Man erkennt jedoch, dass in Zellen, die mit der Nedd4-siRNA behandelt und mit LACV WT infiziert wurden, der Abbau von Rpb1 vermindert ist. Hier ist die hyperphosphorylierte (und somit auch die hypophosphorylierte) Bande immer noch zu erkennen. In Abbildung 7.18 B sieht man in der Quantifizierung, dass das Rpb1-Signal in LACV WT-infizierten Zellen, die mit der Nedd4-siRNA behandelt wurden, um den Faktor 1,8 erhöht ist.

Ein Knockdown von Nedd4 vermindert also den Abbau der Rpb1-Untereinheit der RNAPII. Daraus kann man schließen, dass Nedd4, ähnlich wie in der DNA-Schadensantwort, in diesen Abbau involviert ist.

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde der Effekt von Nedd4 auf die IFN- und ISG56-Induktion untersucht. Hierzu wurde erneut ein Knockdown von Nedd4 induziert.

Abbildung 7.19 A zeigt die IFN- β Antwort in den verschiedenartig behandelten Zellen. Unbehandelte Zellen, die mit rLACVdelNSs infiziert wurden, zeigen wie erwartet eine sehr starke IFN- β -Induktion. Ebenso Zellen, die mit der Kontroll-siRNA oder mit der Nedd4-siRNA behandelt worden sind. Dies ist ebenso der Fall für die ISG56-Induktion (siehe Abbildung 7.19 B). Im Gegensatz dazu induziert LACV WT kein ISG56 in unbehandelten Zellen (w/o, Abbildung 7.19 B). Eine geringe IFN- β -Induktion in LACV WT-infizierten, siRNA-unbehandelten Zellen kann man sehen, wobei dies ein Hintergrundsignal sein könnte. Sowohl für IFN- β als auch für ISG56 sieht man in Zellen, die mit der Kontroll-siRNA behandelt und mit LACV WT infiziert worden sind, eine leichte Erhöhung des Signals. Dies kann an der Transfektion der siRNA liegen, da bekannt ist, dass sowohl DNA- als auch RNA-Transfektionen Immunantworten auslösen können. In Zellen hingegen, die mit Nedd4-siRNA behandelt worden sind, sieht man sowohl bei der IFN- β als auch bei der ISG56-Induktion, dass die Werte von den CTR-Proben zu den Nedd4-Proben um das 4,5-fache (IFN- β) beziehungsweise um das 17-fache (ISG56) ansteigen.

Zusammen mit dem verminderten Abbau der Rpb1-Untereinheit und der erhöhten IFN- β - und ISG56-Induktion durch den Nedd4-Knockdown, kann man schließen, dass Nedd4 zumindest teilweise in den Abbau der RNAPII durch das NSs-Protein von LACV involviert ist.

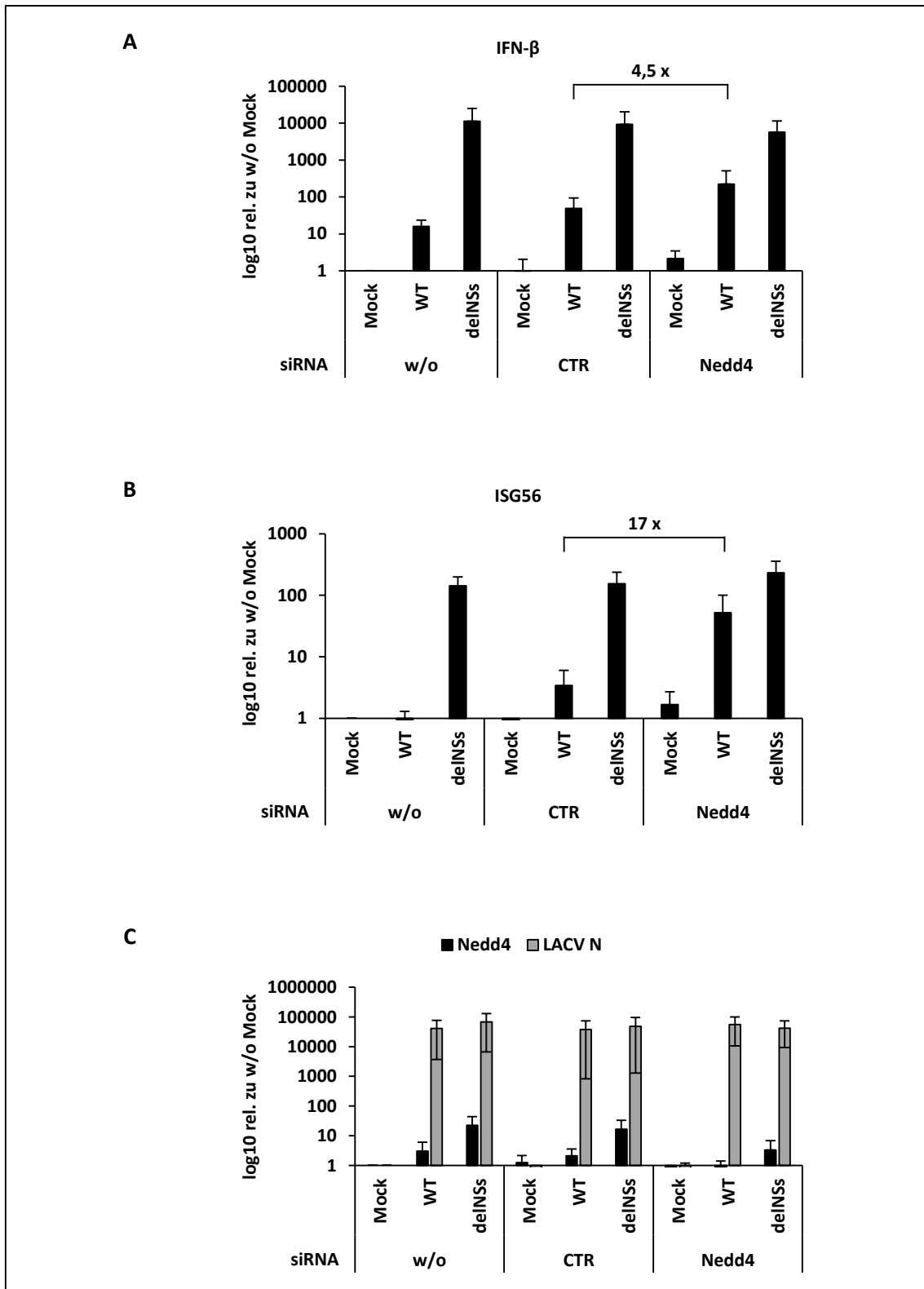


Abbildung 7.19: Effekt eines Ned4-Knockdowns auf die IFN-Inhibition durch LACV WT

HeLa-Zellen wurden mit 50 nM siRNA transfiziert (CTR/Ned4) oder unbehandelt gelassen (w/o) und für 48 h inkubiert. Dann wurde die Transfektion wiederholt und 24 h p. t. (*post transfection*) wurden die Zellen entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdeINSs (delINSs) infiziert und für 16 h inkubiert. Dann wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR für IFN- β (A), ISG56 (B) Ned4 und LACV N (C) analysiert. w/o: *without*, CTR: Kontroll-siRNA.

7.3.2 Subzelluläre Verteilung von Nedd4 in LACV-infizierten Zellen

Da Nedd4 in den Abbau von Rpb1 durch das LACV-NSs-Protein involviert ist, sollte die intrazelluläre Verteilung von Nedd4 während einer LACV-Infektion untersucht werden. Da endogenes Nedd4 in einer Immunfluoreszenz nicht angefärbt werden konnte, weil vermutlich die Nachweisgrenze zu gering war, wurden Huh7-Zellen mit einem Nedd4-Expressionsplasmid transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit einer MOI von 10 mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert, 16 h p.i. fixiert und mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

Transfiziertes Nedd4 ist in nicht-infizierten Zellen homogen in der Zelle verteilt (siehe Abbildung 7.20). Das ist auch der Fall in Zellen, die mit rLACVdelNSs infiziert wurden. Im Gegensatz dazu wird Nedd4 in LACV WT-infizierten Zellen in perinukleäre Strukturen rekrutiert. Das lässt darauf schließen, dass das LACV-NSs-Protein für eine Relokalisation von Nedd4 in die perinukleären Strukturen verantwortlich ist, da es nur in LACV WT-infizierten Zellen exprimiert wird.

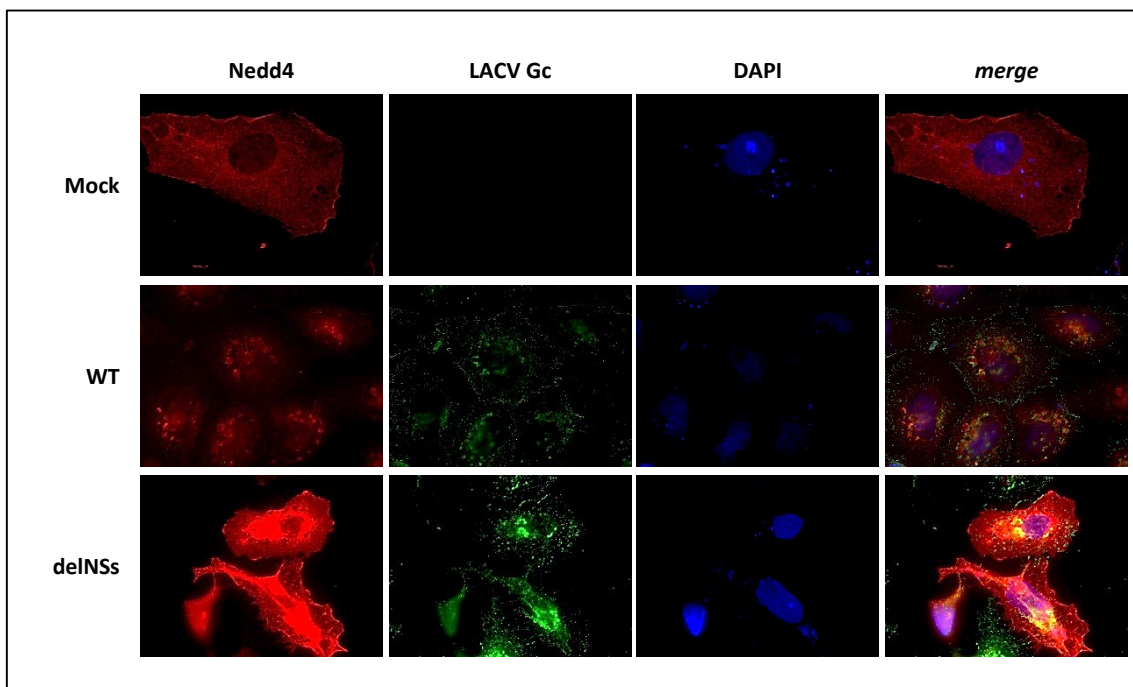


Abbildung 7.20: Intrazelluläre Verteilung von Nedd4 während einer LACV-Infektion

Huh7-Zellen wurden mit 500 ng Nedd4 transfiziert und 24 h p.t. entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe von Antikörpern gegen LACV N (grün) und Nedd4 (rot) gefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M analysiert.

Um zu testen, ob die Relokalisation von Nedd4 von der Ubiquitin-Ligase-Funktion des Proteins abhängt, wurde eine mutierte Variante von Nedd4 verwendet, in der das für die Ligase-Funktion verantwortliche Cystein zu Alanin mutiert wurde (siehe 5.6, Shcherbik *et al.*, 2002).

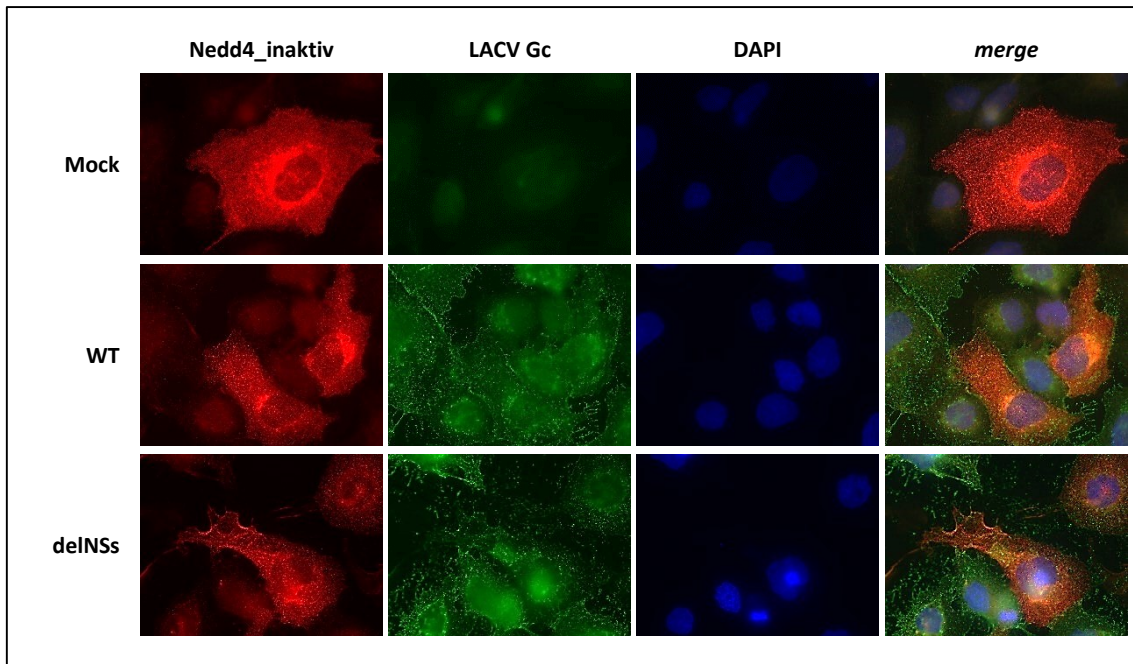


Abbildung 7.21: Intrazelluläre Verteilung einer Ligase-inaktiven Form von Nedd4 während einer LACV-Infektion

Huh7-Zellen wurden mit 500 ng Nedd4_inaktiv transfiziert und 24 h p.t. entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe von Antikörpern gegen LACV N (grün) und Nedd4 (rot) gefärbt und mit Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M analysiert.

Die Ligase-inaktive Form von Nedd4 ist in Mock-Zellen, wie auch das wildtypische Nedd4, homogen in der Zellen verteilt (siehe Abbildung 7.21). Auch in Zellen, die mit rLACVdelNSs infiziert wurden, ist das inaktive Nedd4 homogen verteilt. Interessanterweise ist dies auch der Fall, wenn Zellen mit LACV WT infiziert wurden. Dies deutet daraufhin, dass die Relokalisation von Nedd4 durch LACV-NSs von der Ubiquitin-E3-Ligase-Funktion abhängig ist.

Nedd4 scheint also zumindest teilweise in den Abbau von Rpb1 durch das LACV-NSs-Protein involviert zu sein und wird wahrscheinlich dafür in perinukleäre Strukturen rekrutiert.

Um eine eventuelle Interaktion des LACV-NSs-Proteins mit Nedd4 zu analysieren, wurden Immunpräzipitationsstudien, Kolokalisationsstudien via Immunfluoreszenz und Ko-Sedimentationsstudien durchgeführt. In allen Ansätzen konnte keine Interaktion von LACV-NSs mit Nedd4 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde weiterhin eine Analyse der Interaktion von Nedd4 mit anderen LACV-Proteinen durchgeführt. Hierbei wurde beispielsweise in Immunfluoreszenz-Studien gezeigt, dass Nedd4 nicht mit dem N-Protein von LACV interagiert (Daten nicht gezeigt). Auch in einer groß angelegten Analyse von potentiellen LACV-NSs-Interaktionspartnern wurde Nedd4 nicht gefunden (Andreas Pichlmair).

7.4 Analyse der generellen Wirtszell-Antwort auf eine LACV-Infektion mittels cDNA-Microarray

Durch den Abbau der RNAPII sieht es so aus, als würde das LACV-NSs-Protein einen generellen „Wirtszell-Shut-off“ induzieren. Aufgrund dessen wurde die generelle Wirtszell-Antwort auf eine Infektion mit LACV untersucht. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Krause und Marco Mernberger (Institut für Molekular- und Tumorbologie, Marburg) ein cDNA-Microarray angefertigt. Hierfür wurden MEF (*mouse embryonic fibroblast*)-Zellen (siehe 5.2.1) verwendet, in denen das Signaltransduktionsprotein STAT1 (*signal transducer and activator of transcription*) durch einen Knockout (STAT1^{-/-}) nicht exprimiert wird. Die Verwendung dieser Zellen sollte sicherstellen, dass alle Reaktionen der Zelle auf die LACV-Infektion unabhängig von der IFN-Antwort sind. Für den Microarray wurden diese Zellen in Duplikaten entweder mit LACV WT oder rLACVdelNSs infiziert und nach 16 h lysiert. Um die Wirtszell-Antwort mit der Antwort auf einen DNA-Schaden zu vergleichen, wurden Zellen außerdem noch mit Doxorubicin behandelt. Dies ist ein DNA-Interkalator, der durch die Interkalation das Enzym Topoisomerase II daran hindert, die DNA für die Replikation aufzuwinden. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von Qiagen aufgereinigt und noch während der Aufreinigung mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen von zellulärer DNA befreit. Die Proben wurden dann zur Kontrolle mittels qRT-PCR analysiert. Außerdem wurden die Viren mittels RT-PCR, Sequenzierung, SDS-PAGE und Western-Blot kontrolliert. Die Kontrollen ergaben, dass die Viren den erwarteten Genotyp haben (Sequenzierung) und dass das LACV WT-Virus wie erwartet Rpb1 abbaut und die IFN- und ISG-Induktion hemmt (siehe Abbildung 7.22).

Wie aus Abbildung 7.22 ersichtlich, induziert rLACVdelNSs auch in murinen Zellen eine IFN- β -Induktion, sowie eine Induktion von ISG56 und IP-10. Im Gegensatz dazu inhibiert LACV WT die IFN-Induktion. Auch in Doxorubicin-behandelten Zellen wird keine Immunantwort ausgelöst. Weiterhin ist zu beobachten, dass beide Viren gleich schnell in den Zellen wachsen.

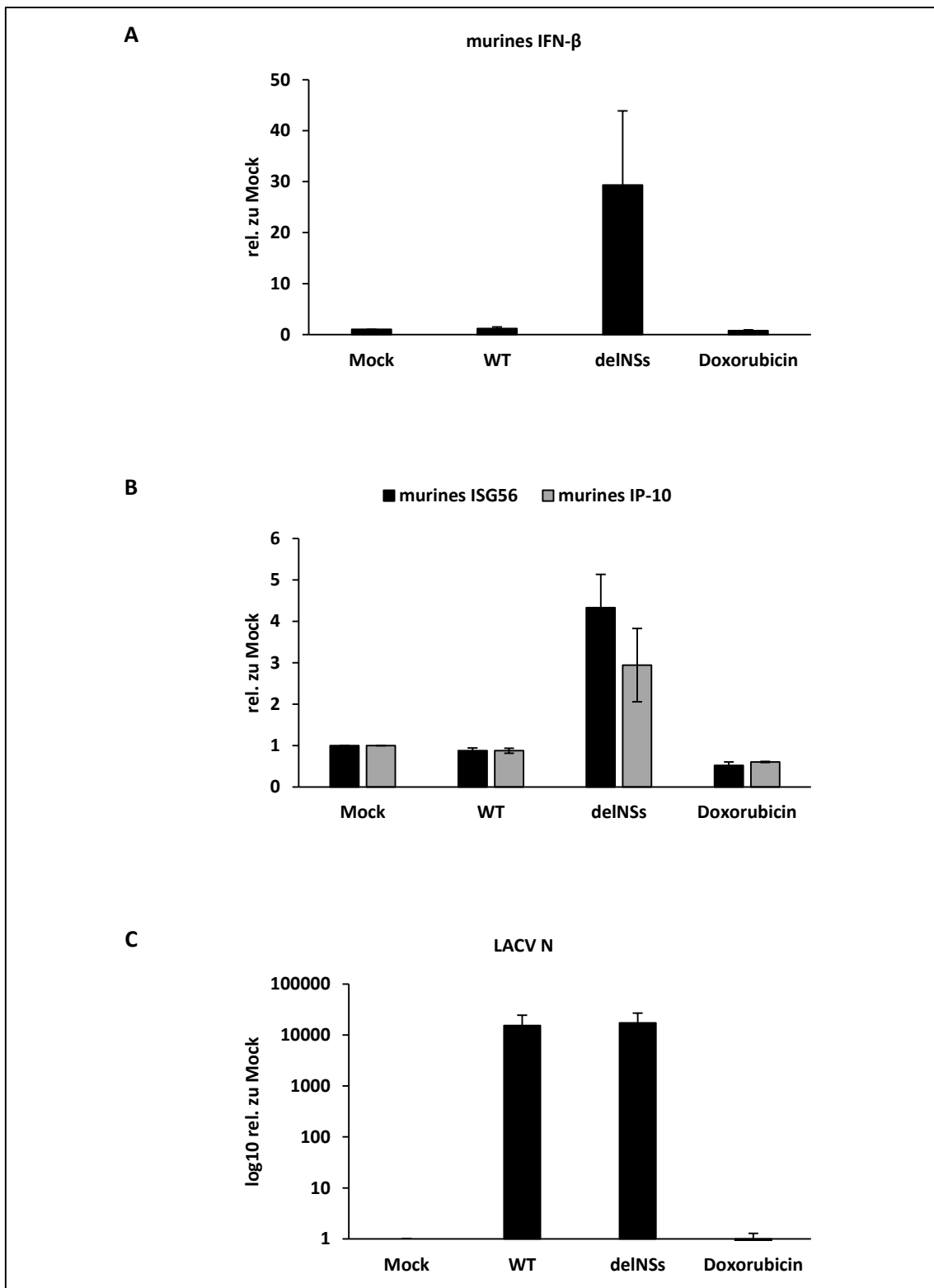


Abbildung 7.22: qRT-PCR als Kontrolle für den Microarray

MEF-STAT1^{-/-}-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdeINSs (deINSs) infiziert. Weiterhin wurden Zellen mit 0,5 μ g/ml Doxorubicin behandelt. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR mit Primern für murines IFN- β , ISG56, IP-10 und LACV N analysiert. Zur Normalisierung wurde die mRNA der murinen GAPDH gemessen.

7.4.1 Heatmap-Analyse der cDNA-Microarray-Daten

Nach Analyse der Daten, die der cDNA-Microarray geliefert hat, konnten sogenannte „Heatmaps“ erstellt werden, in denen Gene, die aufgrund der Eigenschaften der kodierten Proteine zusammengehören, in Gruppen eingeteilt werden und für die aufgezeigt wird, ob sie durch die Infektion mit LACV WT oder rLACVdeINs oder durch die Behandlung mit Doxorubicin hoch- (rot) oder herunter- (blau) reguliert werden.

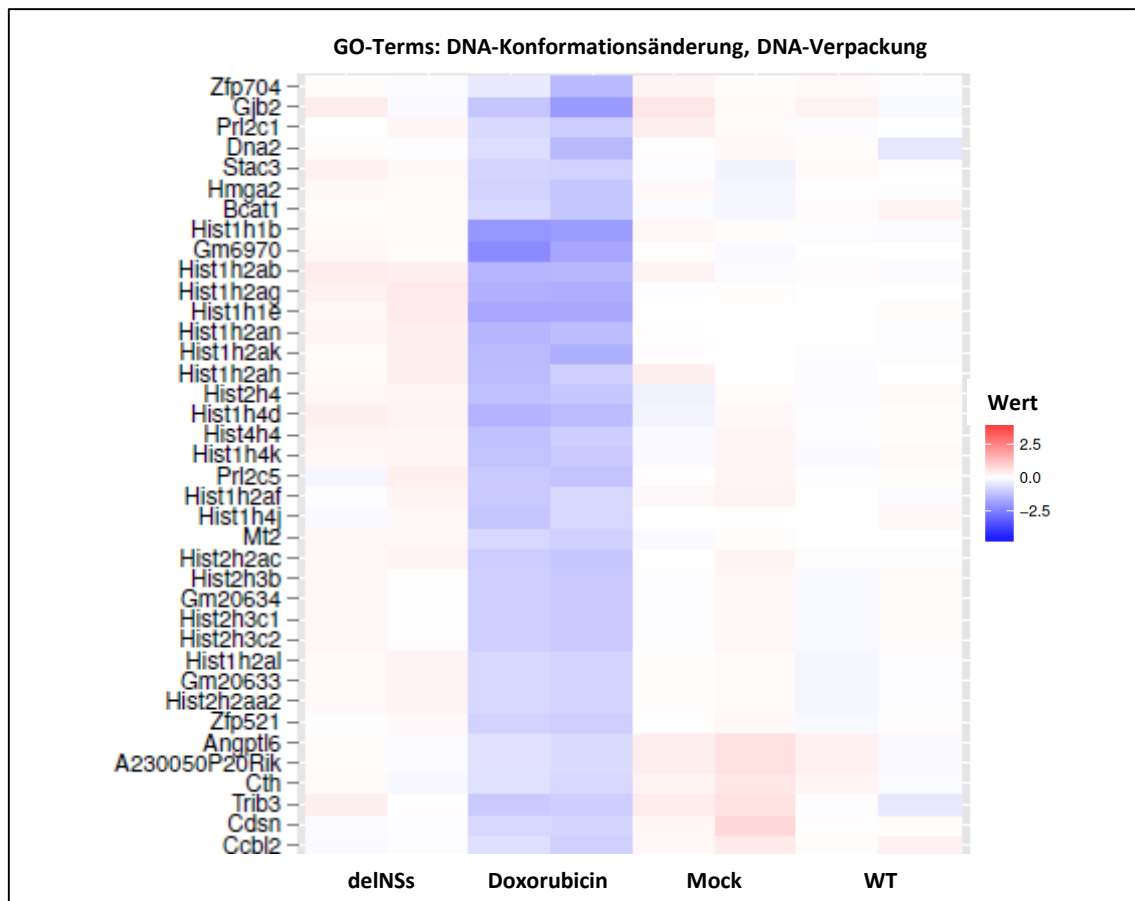


Abbildung 7.23: Durch Doxorubicin herunterregulierte Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse

Darstellung der durch Doxorubicin herunterregulierten Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse. Für jede Probe wurden Duplikate angefertigt. Hochregulierte Gene werden in rot dargestellt, herunterregulierte in blau. Nach einer „Gene Ontology“-Analyse (www.geneontology.com) werden die regulierten Proteine zu den Proteinen gezählt, die DNA-Konformationsänderung und -Verpackung regulieren. deINs: rLACVdeINs, Mock: nicht-infizierte Zellen, WT: LACV WT.

In der Abbildung 7.23 sieht man, dass die Gene dieses Clusters hauptsächlich durch Doxorubicin beeinflusst werden. Dabei werden alle herunterreguliert (blaue Farbe). Bei den meisten Genen handelt es sich um Gene, die mit der zellulären DNA verknüpft sind, zum Beispiel werden Zinkfinger-Proteine (Zfp704) und viele Histone herunterreguliert (siehe Abbildung 7.23). Interessanterweise ist auch das Dna2-Protein in Doxorubicin-behandelten Zellen herunterreguliert. Dieses

ist eine DNA-Replikations-abhängige Helikase/Nuklease und sie könnte durch die Interkalation des Doxorubicins in die DNA gestört sein.

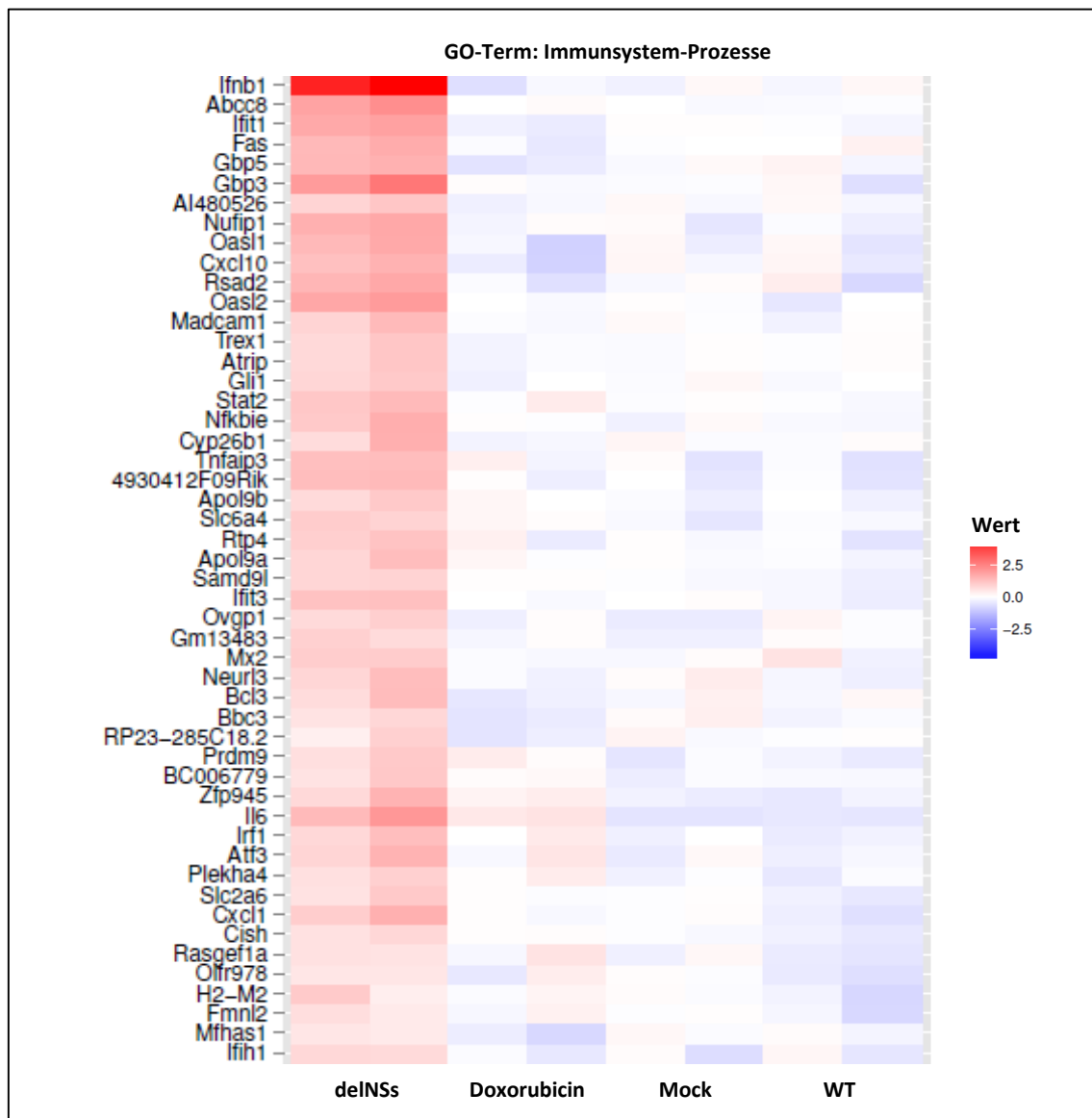


Abbildung 7.24: Durch rLACVdeINs hochregulierte Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse

Darstellung der durch rLACVdeINs hochregulierten Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse. Für jede Probe wurden Duplikate angefertigt. Hochregulierte Gene werden in rot dargestellt, herunterregulierte in blau. Nach einer „Gene Ontology“-Analyse (www.geneontology.com) werden die meisten regulierten Proteine zu den Proteinen gezählt, die Prozesse des Immunsystems regulieren. deINs: rLACVdeINs, Mock: nicht-infizierte Zellen, WT: LACV WT.

In Abbildung 7.24 wird deutlich, dass hier sehr viele Gene durch rLACVdeINs hochreguliert werden, die in den anderen Zellen entweder nicht hochreguliert und, in manchen Fällen, sogar herunterreguliert werden. Diese Gene gehören hauptsächlich zum angeborenen Immunsystem; so wird zum Beispiel IFN- β stark durch rLACVdeINs induziert. Des Weiteren werden IFIT1, OASL, CXCL10, NF- κ B, TNF- α , Mx2 und IL-6 durch rLACVdeINs induziert. Im Gegensatz dazu werden

beispielsweise TNF- α , OASL und IL-6 durch eine Infektion mit LACV WT in den Zellen herunter-reguliert.

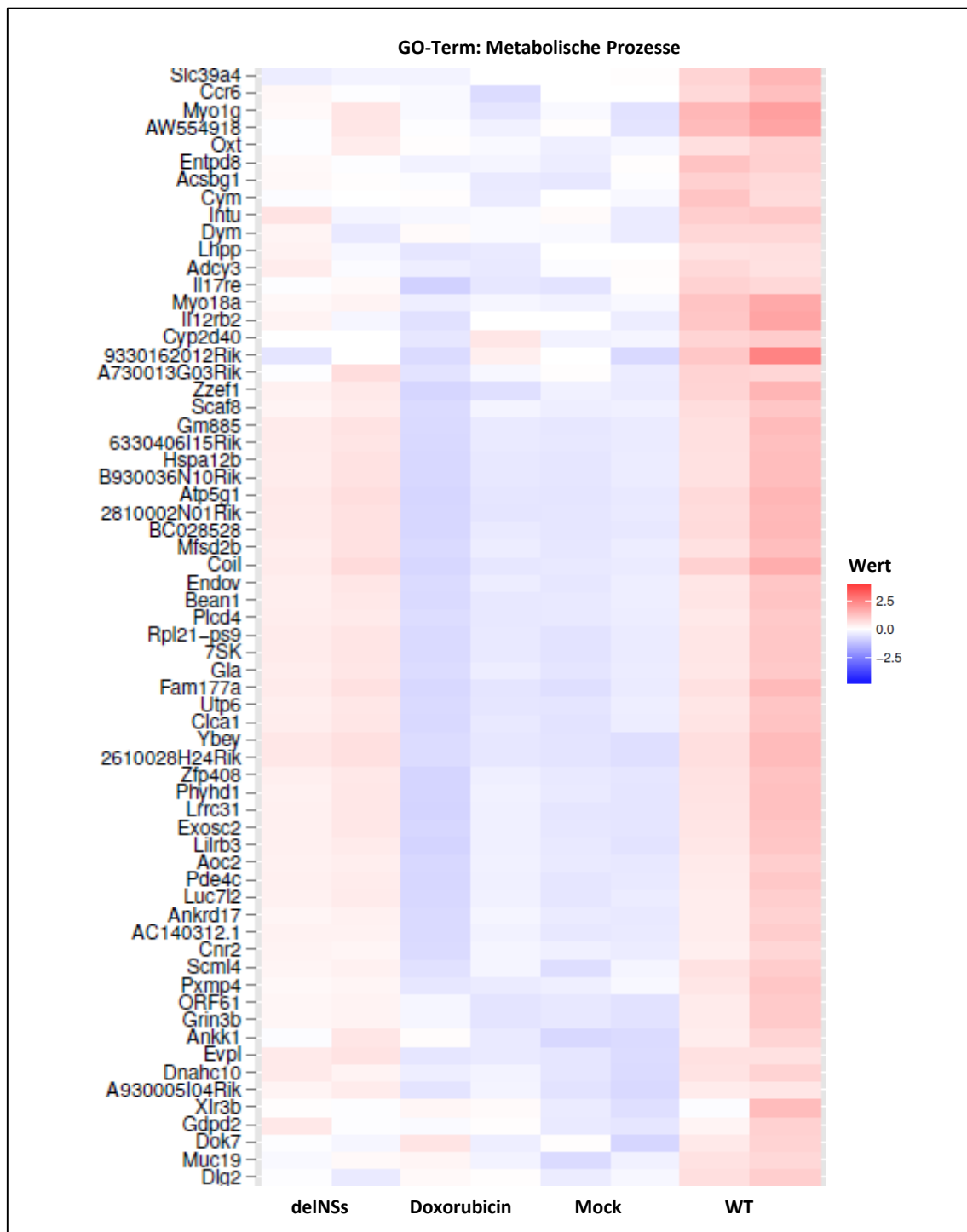


Abbildung 7.25: Durch LACV WT hochregulierte Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse

Darstellung der durch LACV WT hochregulierten Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse. Für jede Probe wurden Duplikate angefertigt. Hochregulierte Gene werden in rot dargestellt, herunterregulierte in blau. Nach einer „Gene Ontology“-Analyse (www.geneontology.com) werden die meisten regulierten Proteine zu den Proteinen gezählt, die metabolische Prozesse regulieren. deINNs: rLACVdeINNs, Mock: nicht-infizierte Zellen, WT: LACV WT.

In Abbildung 7.25 erkennt man, dass in dieser Heatmap viele Gene durch LACV WT hochreguliert werden. Sie greifen in verschiedene zelluläre Mechanismen ein; so ist zum Beispiel das Myosin-IG hochreguliert, welches in zellulären Bewegungsabläufen eine Rolle spielt, ebenso wie das Intu (*Inturned Planar Cell Polarity Effector Homolog*)-Protein. Weiterhin werden auch Gene hochreguliert, deren Proteine in der Lipidsynthese eine Rolle spielen, zum Beispiel die Acyl-CoA-Synthetase oder die Phospholipase C, Delta 4. Interessanterweise wird außerdem ein Protein hochreguliert, das mit der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 interagiert: Bean1 (*brain expressed, associated with Nedd4, 1*). Weiterhin fällt auf, dass die 7SK-RNA durch das LACV-NSs-Protein hochreguliert wird. Dies ist besonders interessant, da bekannt ist, dass die 7SK-RNA eine regulatorische Rolle in der Transkription einnimmt.

7.4.2 Ingenuity Pathway-Analyse der cDNA-Microarray-Daten

Um die Daten noch etwas genauer zu analysieren, wurde mit der „Ingenuity Pathway Analysis Software“ gearbeitet. Dieses Programm sucht nach Genen, die unterschiedlich reguliert sind und stellt sie in Netzwerken in Zusammenhang zueinander. Interessanterweise war das immunologische Netzwerk der Zellen bei beiden Viren am stärksten reguliert.

Man kann anhand Abbildung 7.26 und Abbildung 7.27 feststellen, dass beide Viren Einfluss auf das immunologische Netzwerk haben, obwohl in den Zellen das Signaltransduktionsprotein STAT1 nicht exprimiert wird, um sicherzustellen, dass keine sekundären IFN-gesteuerten Effekte auftreten. Während rLACVdeINSs aufgrund des fehlenden Virulenzfaktors NSs viele Gene in diesem Netzwerk hochreguliert (zum Beispiel IFN- α , IFN- β , IFIT1 und IFIT3, CXCL10, IL-6, NF- κ B und STAT2), sind diese Gene in den LACV WT-infizierten Zellen spezifisch herunterreguliert.

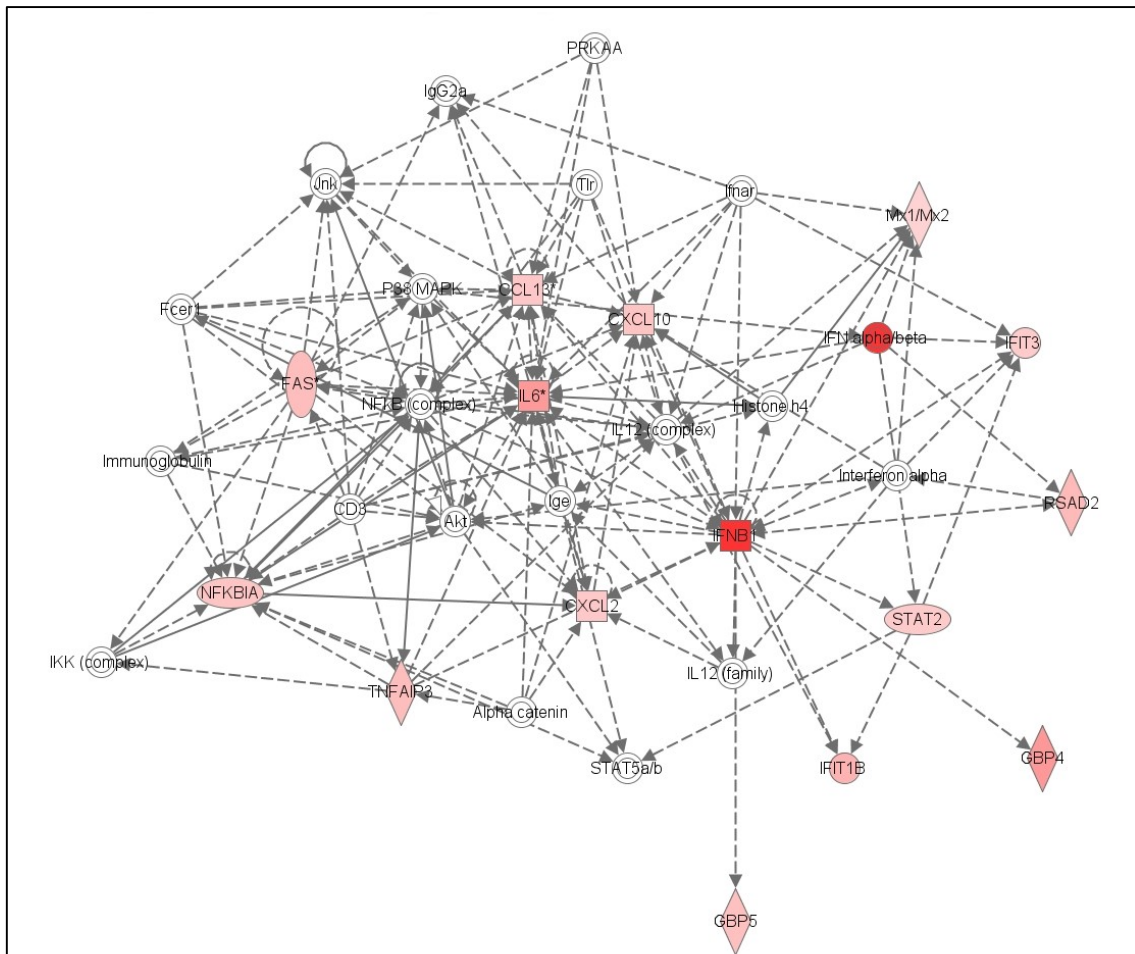


Abbildung 7.26: Immunologisches Netzwerk in rLACVdeINSs-infizierten Zellen

Mit der „Ingenuity Pathway Analysis Software“ wurde nach zusammenhängenden Genen in rLACVdeINSs-infizierten Zellen gesucht, die reguliert sind. Rot: Hochregulation. Es wurde hier eine Farbskala verwendet, die die Regulationsstärke verdeutlicht (hellrot: schwache Regulation, dunkelrot: starke Regulation). Dargestellt sind hier die Proben der rLACVdeINSs-infizierten Zellen versus nicht-infizierte Zellen (Mock).

Mit der „Ingenuity Pathway Analysis Software“ wurde nach zusammenhängenden Genen in LACV WT-infizierten Zellen gesucht, die reguliert sind. Grün: Runterregulation. Es wurde hier eine Farbskala verwendet, die die Regulationsstärke verdeutlicht (hellgrün: schwache Regulation, dunkelgrün: starke Regulation). Dargestellt sind hier die Proben der LACV WT-infizierten Zellen versus rLACVdelNSs-infizierte Zellen.

7.5 Einfluss von LACV auf die 7SK-RNA

92

regulatorische Rolle einzunehmen. Die nicht-kodierende 7SK-RNA wurde in dem Microarray-Experiment in LACV WT-infizierten Zellen hochreguliert, nicht aber in rLACVdeINSs-infizierten Zellen. Die 7SK-RNA ist eine 331 Nukleotid (nt) lange RNA, die durch die RNA-Polymerase III (RNAPIII) hergestellt wird. Sie stellt aufgrund ihrer Sekundärstruktur eine Bindungsplattform für Proteine dar und wirkt dadurch regulatorisch auf den Transkriptionsfaktor pTEFb (positiver Transkriptionselongationsfaktor b). Die 7SK-RNA rekrutiert pTEFb und außerdem die Proteine HEXIM1 oder HEXIM2 (*hexamethylene bisacetamide (HMBA)-induced mRNA 1/2*), welche die Kinaseaktivität von pTEFb inhibieren. Wenn die Transkription starten soll, löst sich die 7SK-RNA von pTEFb und bindet stattdessen heterogene Ribonukleoproteinkomplexe (hnRNPs). Dadurch kann pTEFb das Serin2 (Ser2) der C-terminalen Domäne (CTD) der Rpb1-Untereinheit der RNA-Polymerase II (RNAPII) phosphorylieren und die Transkription kann beginnen (Diribarne & Bensaude, 2009).

Eine Hochregulation der 7SK-RNA in LACV WT-infizierten Zellen könnte also zur Folge haben, dass die Transkription, neben dem Abbau von Rpb1, zusätzlich inhibiert wird.

7.5.1 Induktion der 7SK-RNA durch LACV

Die Hochregulation der 7SK-RNA in murinen Zellen sollte in humanen Zellen verifiziert werden. Hierfür wurden verschiedene Zelllinien mit LACV WT oder rLACVdeINSs infiziert. Weiterhin wurden die Zellen mit α -Amanitin, Actinomycin D und Doxorubicin behandelt. Dies sind Agenzien, die entweder zum Abbau von RNAPII führen oder eine DNA-Schadensantwort auslösen und hier als Kontrolle fungieren. Nach 16 h wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR analysiert.

In Abbildung 7.28 ist zu beobachten, dass LACV WT in A549-Zellen eine signifikante Induktion der 7SK-RNA im Vergleich zu Mock-Zellen bewirkt. Auch rLACVdeINSs induziert die 7SK-RNA, allerdings nicht so stark wie LACV WT. In HeLa-Zellen wird die 7SK-RNA weder von LACV WT noch von rLACVdeINSs induziert. In Huh7-Zellen kann man erneut die signifikante Erhöhung der 7SK-RNA durch LACV WT, aber auch durch rLACVdeINSs erkennen. Im Gegensatz zu dem LACV-NSs-Protein induzieren die Inhibitoren der RNAPII die 7SK-RNA nicht. Das zeigt, dass der Effekt NSs-spezifisch ist.

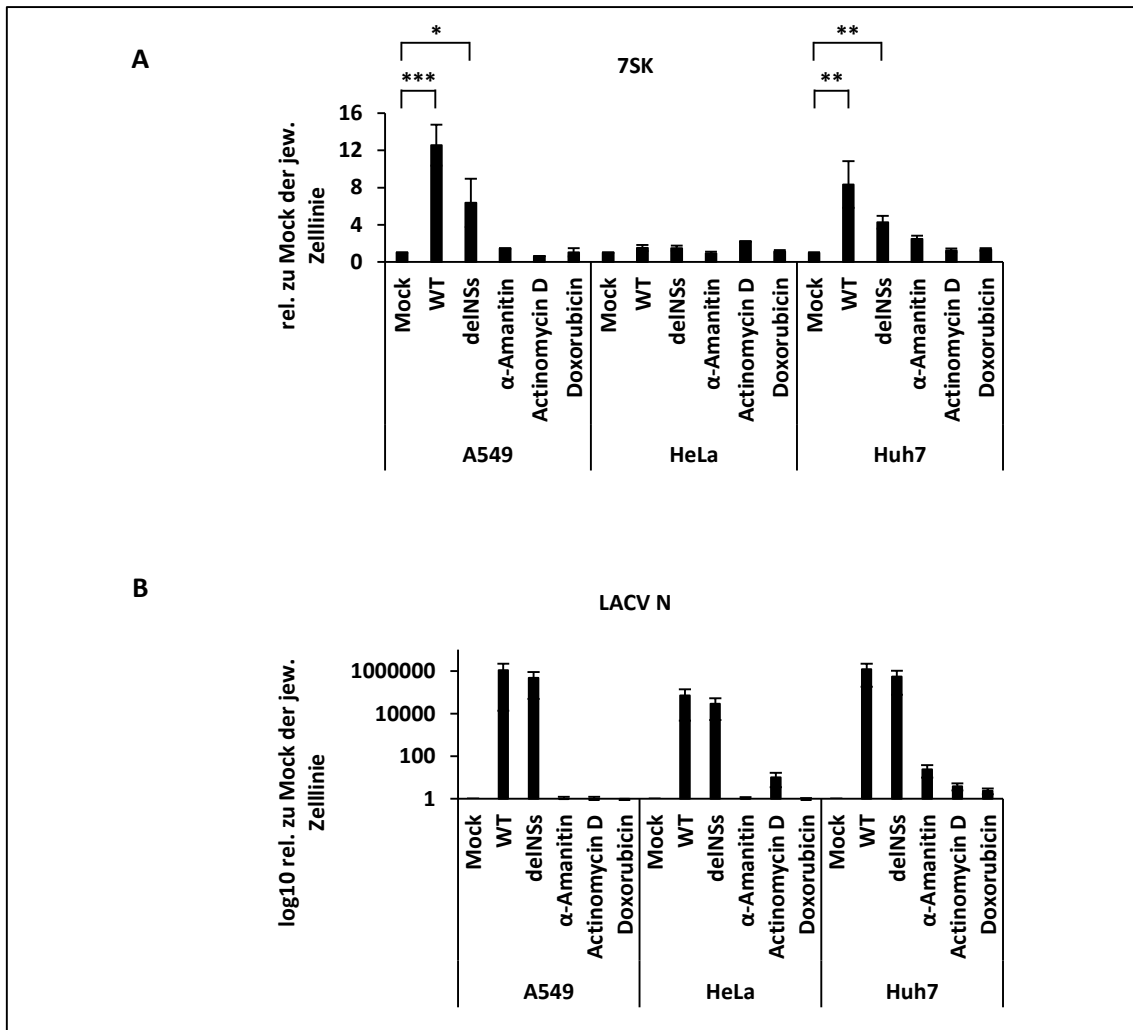


Abbildung 7.28: Induktion der 7SK-RNA durch LACV

A549-, HeLa- und Huh7-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. Weiterhin wurden Zellen mit 10 μ g/ml α -Amanitin, 1 μ g/ml Actinomycin D oder 0,5 μ g/ml Doxorubicin behandelt. 16 h danach wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR mit Primern für 7SK-RNA und LACV N analysiert; zur Normalisierung wurde die mRNA von GAPDH gemessen. Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

7.5.2 Induktion der 7SK-RNA durch andere Viren

Um zu testen, ob die Induktion der 7SK-RNA ein alleiniges Merkmal von LACV ist, oder ob sie auch durch andere Viren induziert werden kann, wurden A549-Zellen mit dem Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) und einem Adenovirus (AdV) infiziert. Als Zelllinie wurden A549-Zellen gewählt, da diese den größten Effekt in der Induktion der 7SK-RNA durch LACV gezeigt haben. VSV inhibiert zwar die zelluläre Transkription, allerdings findet hier kein Abbau von RNAPII statt.

Stattdessen wird der Transkriptionsfaktor IID inaktiviert (Yuan *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu hat AdV keinen Einfluss auf die Transkription durch RNAPII.

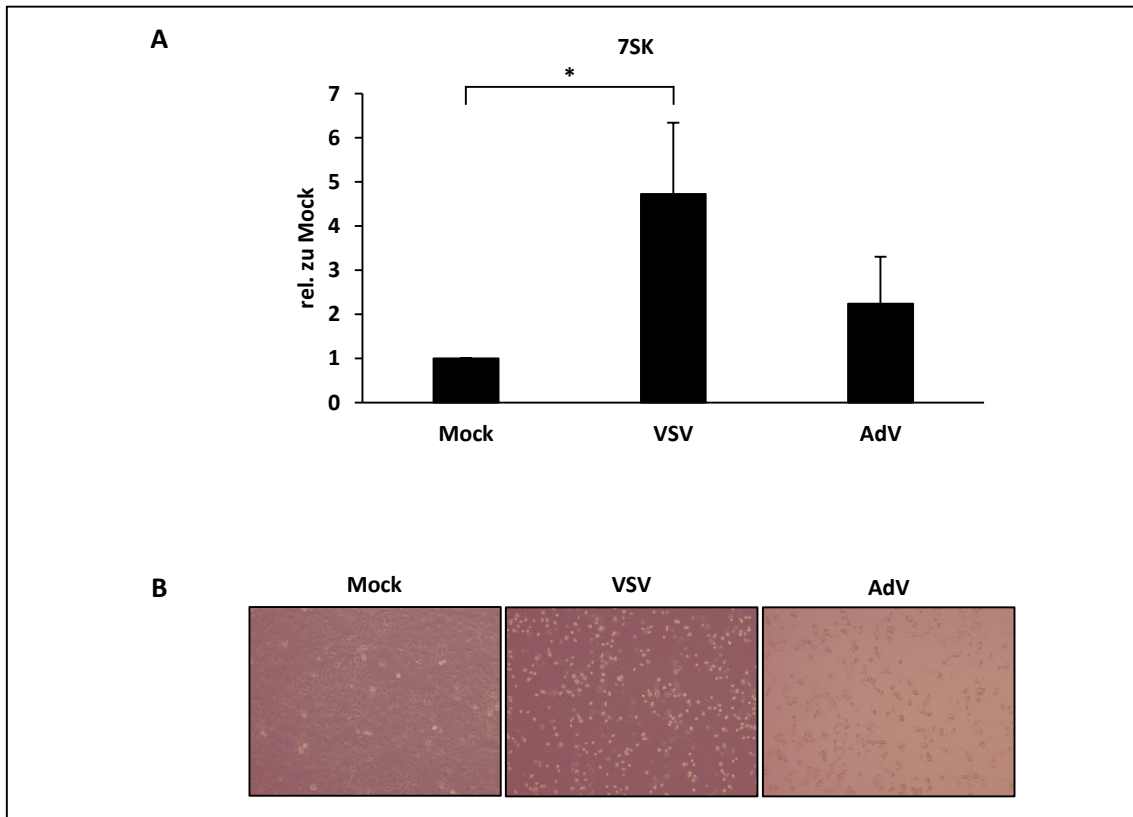


Abbildung 7.29: Induktion der 7SK-RNA durch andere Viren

A. A549-Zellen wurden entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit dem Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) oder mit 100 μ l Adenovirus (AdV) infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR mit Primern für 7SK-RNA analysiert; zur Normalisierung wurde die mRNA von GAPDH gemessen. Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$). **B.** Mikroskopie-Bilder der A549-Zellen 24 h nach Infektion zur Kontrolle des CPEs (*cytopathic effect*).

In Abbildung 7.29 wird deutlich, dass VSV, genau wie LACV, das 7SK-RNA-Level in A549-Zellen signifikant erhöht. In AdV-infizierten Zellen ist das Level der 7SK-RNA hingegen nicht signifikant erhöht. Die 7SK-RNA wird also nicht nur durch die Expression des LACV-NSs-Proteins induziert, sondern auch durch die Expression von Proteinen des VSV, das ebenso wie LACV die zelluläre Transkription inhibiert.

7.5.3 Analyse des Einflusses der 7SK-RNA in LACV-infizierten Zellen mittels siRNA

Um den Einfluss der 7SK-RNA in einer LACV-Infektion zu untersuchen, wurde ein Knockdown der 7SK-RNA durch siRNA-Transfektion erstellt. Hierfür wurden A549-Zellen mit siRNA gegen die 7SK-RNA transfiziert und 48 h später mit LACV WT oder rLACVdeINSs infiziert. Die Zellen wurden 16 h p.i. lysiert und mittels qRT-PCR analysiert.

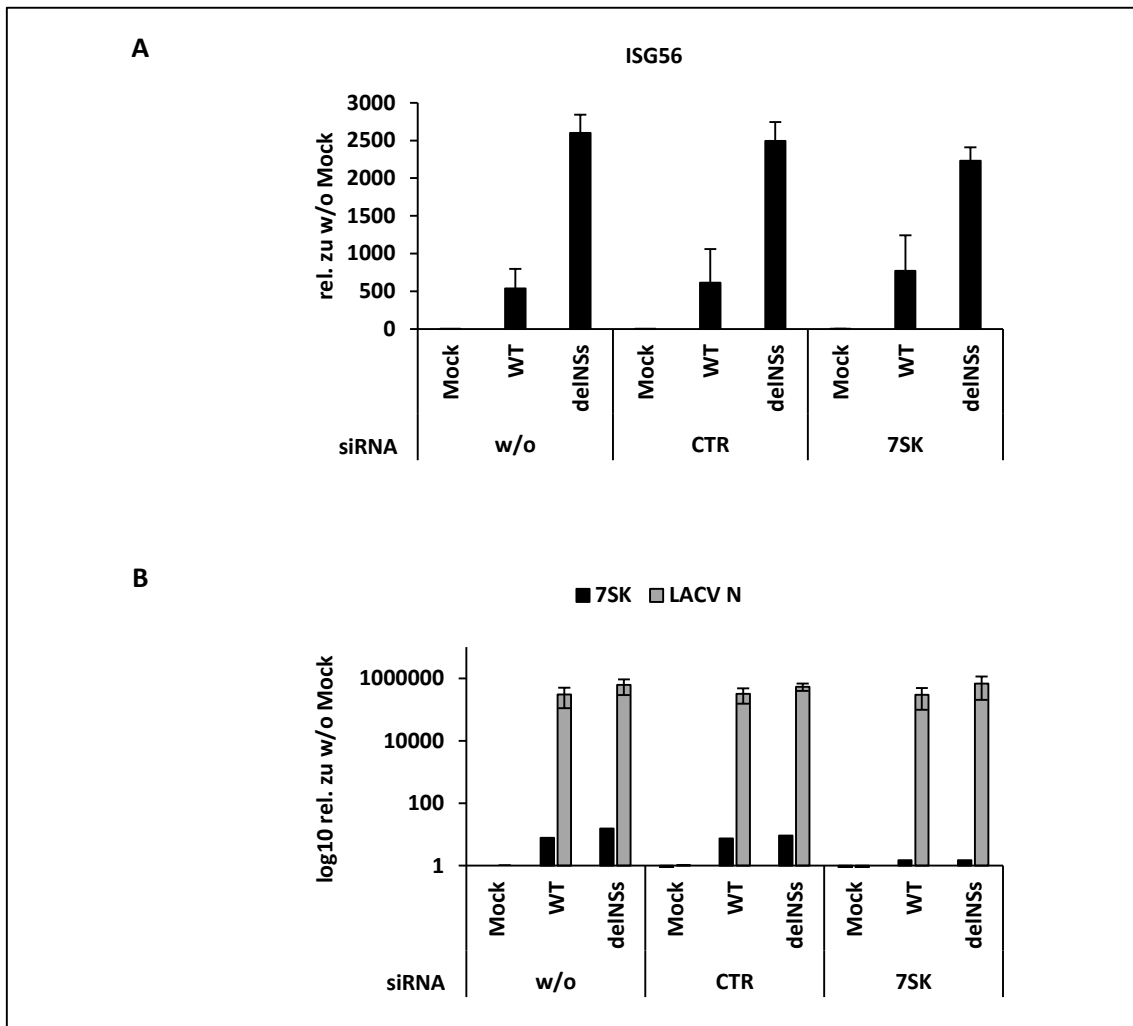


Abbildung 7.30: Effekt eines 7SK-RNA-Knockdowns auf die ISG56-Inhibition durch LACV WT

A549-Zellen wurden entweder nicht behandelt (w/o), mit 50 nM Kontroll-siRNA (CTR) oder gegen 7SK-RNA transfiziert und 48 h lang inkubiert. Dann wurden die Zellen entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdeINSs (deINSs) infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels qRT-PCR mit Primern für ISG56 (**A**) und 7SK-RNA und LACV N (**B**) analysiert. Zur Normalisierung wurden Primer für GAPDH verwendet. w/o: *without*, CTR: Kontroll-siRNA. Quantifizierung aus zwei unabhängigen Experimenten.

Wie zu erwarten war, induziert rLACVdelNSs in allen Proben ISG56, unabhängig davon, ob die Zellen unbehandelt waren, mit einer Kontroll-siRNA behandelt worden sind oder ob in den Zellen das 7SK-RNA-Level herunterreguliert war (Abbildung 7.30). Im Gegensatz dazu ist die ISG56-Induktion in LACV WT-infizierten Zellen extrem gering, weil RNAPII abgebaut wird und somit keine ISG56 mRNA hergestellt werden kann. Interessanterweise wird dieser Effekt nicht durch den Knockdown der 7SK-RNA aufgehoben (Abbildung 7.30 A).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das LACV-NSs-Protein i) eine Poly-Ubiquitylierung in infizierten Zellen induziert, die Lysin48 (K48) verlinkt ist, ii) eine Ubiquitylierung von Rpb1 induziert, iii) eine Relokalisation der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 veranlasst, um den Abbau von Rpb1 zu gewährleisten, iv) in diverse metabolische Prozesse der Zelle eingreift, v) spezifisch die RNA-Polymerase II an Promotern von Genen der angeborenen Immunantwort abbaut und vi) die 7SK-RNA hochreguliert.

8 Diskussion

Das La Crosse-Virus (LACV) kann in Kindern und Jugendlichen eine schwere Enzephalitis und Meningitis auslösen, die durch die Zerstörung der Nervenzellen weitreichende Folgen haben können. LACV inhibiert mit Hilfe seines Virulenzfaktors NSs (*non-structural protein encoded on the S segment*) die Interferon (IFN)-Antwort, indem NSs den Abbau der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II (RNAPII), Rpb1, induziert. Dieser Abbau wird so schnell induziert, dass eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) und somit eine IFN-Induktion aufgehoben wird. In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der Abbau von Rpb1 Ähnlichkeiten zu der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) hat, da neben dem Abbau auch die Induktion von pak6 und die Phosphorylierung des Histons H2AX durch LACV Wildtyp (WT) induziert werden (Verbruggen *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von LACV auf das Ubiquitin-Proteasom-System untersucht, weil gezeigt wurde, dass der Abbau von Rpb1 über dieses System verläuft. Weiterhin wurde der Einfluss der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) untersucht, da gezeigt wurde, dass diese Ligase in den Abbau von Rpb1 nach einem DNA-Schaden involviert ist (Harreman *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde die generelle Wirtszell-Antwort auf eine LACV-Infektion analysiert.

8.1 Einfluss von LACV auf das Ubiquitin-Proteasom-System

8.1.1 LACV-NSs induzierte generelle Poly-Ubiquitinylierung und deren Verlinkung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das LACV-NSs-Protein eine generelle Poly-Ubiquitinylierung in infizierten Zellen induziert (siehe Kapitel 7.2.2 und Abbildung 7.7). Diese Ubiquitinylierung ist Lysin48 (K48) verlinkt, was durch Ubiquitin-K48-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 7.2.3.2, Abbildung 7.13 und Abbildung 7.15). Eine Verlinkung von Ubiquitin

über K48 induziert einen Abbau des Proteins durch das Proteasom (Pickart, 1997). Dass das Proteasom für den LACV-NSs-induzierten Abbau von Rpb1 zuständig ist und dass Rpb1 vorher über Ubiquitin-K48-Ketten poly-ubiquitinyliert wird, passt zu den vorhergehenden Befunden, dass eine Inhibition des Proteasoms durch MG132 den Abbau von Rpb1 hemmt.

Ein Abbau durch das Proteasom kann auch erfolgen, wenn eine andere Ubiquitin-Verlinkung verwendet wird. So sind Ubiquitin-K11-Verlinkungen wichtig für den Abbau von Zellzyklus-Regulatoren (Komander & Rape, 2012). Auch Ubiquitin-K63-Verlinkungen können modifizierte Substrate dem Abbau durch das Proteasom zuführen (Saeki *et al.*, 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass Rsp5, das Hefe-Homolog des humanen Nedd4, Ubiquitin-K63-Verlinkungen katalysiert (Saeki *et al.*, 2009). Diese können dann, wenn es sich zum Beispiel um Membranrezeptoren handelt, endozytiert werden (Galan & Haguenaue-Tsapis, 1997; Terrell *et al.*, 1998). Oftmals handelt es sich bei diesem Vorgang um eine Mono-Ubiquitinylierung. Eine Verlinkung über Ubiquitin-K63 durch Nedd4 kann aber auch zum endosomal-lysosomalen Abbau von Proteinen führen (Tofaris *et al.*, 2011). Der Grund, warum in den hier beschriebenen Experimenten keine generelle Ubiquitin-K63-Verlinkung beobachtet wird, könnte der sein, dass der Abbau von Rpb1 tatsächlich so abläuft, wie es auch in der DNA-Schadensantwort der Fall ist. In Harreman *et al.* (2009) wird beschrieben, dass Rsp5 ein Mono-Ubiquitin oder eine Ubiquitin-K63-Kette an Rpb1 ligiert. Dieses Signal induziert jedoch nicht den Abbau. Stattdessen kann die Ubiquitin-K63-Kette auf ein Mono-Ubiquitin gekürzt werden und dient dann als Erkennungssignal für einen Komplex aus Elongin C und Cullin3. Dieser Komplex wiederum, der ebenfalls eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt, produziert die Ubiquitin-K48-verlinkte Poly-Ubiquitinylierung, die als Erkennung für das Proteasom dient (Harreman *et al.*, 2009). Auch für humane Zellen postulieren die Autoren, dass Nedd4 mit einem Elongin A/B/C-Cullin5-Komplex für die Poly-Ubiquitinylierung von Rpb1 verantwortlich ist (Harreman *et al.*, 2009). Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Nedd4 zumindest teilweise in den Abbau von Rpb1 durch das LACV-NSs-Protein involviert ist (siehe Kapitel 7.3), kann man annehmen, dass bei einer LACV-Infektion derselbe Mechanismus benutzt wird, der auch in der DNA-Schadensantwort verwendet wird. Bekräftigt wird dies durch die gezeigte Interaktion von LACV-NSs mit Elongin C (unpublizierte Daten, Paul Verbruggen und Andreas Schön).

8.1.2 LACV-NSs induzierte Ubiquitinylierung von Rpb1

Der Pulldown von Rpb1 durch die verwendeten TUBEs (*tandem ubiquitin binding entities*) zeigt, dass spezifisch Rpb1 ubiquitinyliert und somit dem Abbau zugeführt wird. Auch hier ergibt sich wieder die Parallele zu der DNA-Schadensantwort. Für den Nachweis der ubiquitinylierten Rpb1-Untereinheit wurde ein Antikörper verwendet, der an das phosphorylierte Serin5 (Ser5) der C-terminalen Domäne (CTD) von Rpb1 bindet. Mit Hilfe dieses Pulldown-Assays konnte jedoch nicht gezeigt werden, wie die Ubiquitinylierung an Rpb1 verlinkt ist und ob es sich um eine Mono- oder Poly-Ubiquitinylierung handelt. Aufgrund der großen „verschmierten“ Bande in Abbildung 7.17 kann man jedoch davon ausgehen, dass es sich um Poly-Ubiquitinylierungen handelt.

8.1.3 Abhängigkeit von LACV vom Proteasom

In Abbildung 7.9 und Abbildung 7.12 wurde gezeigt, dass U2OS-Zellen, die mutiertes Ubiquitin (K48R und K63R) überexprimieren, nicht mit LACV infizierbar sind. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in diesen Zellen schwer beeinträchtigt und die Zellen vertragen die Überexpression des mutierten Ubiquitins nicht gut, was sich auch morphologisch bemerkbar macht, da sie sich in ihrer Form verändern und viele Zellen absterben (Daten nicht gezeigt). Die erfolglose Infektion könnte zum einen davon kommen, dass die Zellen durch die Stressantwort auf die Überexpression des mutierten Ubiquitins sich nicht infizieren lassen, zum anderen könnte es auch sein, dass LACV so von einem intakten Ubiquitin-Proteasom-System abhängig ist, dass eine initiale Infektion zwar möglich ist, aber ein kompletter Replikationszyklus nicht stattfinden kann. Diese Annahme wird verstärkt durch die Tatsache, dass die Gabe des Proteasom-Inhibitors MG132 die Virusreplikation ebenfalls hemmt (siehe Abbildung 7.6).

Nicht nur LACV verwendet das Ubiquitin-Proteasom-System, um ein zelluläres Protein abzubauen, damit dieses nicht zur IFN-Induktion verwendet werden kann. Auch das verwandte Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) benutzt das Ubiquitin-Proteasom-System, um die p62-Untereinheit des Transkriptionsfaktors IIH (TFIIH) abzubauen (Kainulainen *et al.*, 2014; Kalveram *et al.*, 2011). Hierfür wird das F-Box-Protein FBXO3 rekrutiert (Kainulainen *et al.*, 2014). Andere RNA-Viren bauen Proteine ab, die an der IFN-Induktion beteiligt sind (Didcock *et al.*, 1999; Ulane & Horvath, 2002; Yu *et al.*, 2003). Auch DNA-Viren wie zum Beispiel Adenoviren benutzen das Ubiquitin-Proteasom-System, um zelluläre Proteine abzubauen (Querido *et al.*, 2001).

8.2 Einfluss der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 in einer LACV-Infektion

Da in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, dass eine LACV WT-Infektion Merkmale der DNA-Schadensantwort aufweist (Verbruggen *et al.*, 2011), sollten in dieser Arbeit weitere eventuell vorhandene Gemeinsamkeiten analysiert werden. In Kapitel 7.2 wurde gezeigt, dass eine LACV WT-Infektion die generelle Poly-Ubiquitinylierung in Zellen erhöht und außerdem die Rpb1-Untereinheit der RNAPII ubiquitinyliert. Da schon gezeigt wurde, dass Elongin C mit dem LACV-NSs-Protein interagiert (unpublizierte Daten, Paul Verbruggen und Andreas Schön), wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 untersucht, da beide Ligasen in der DNA-Schadensantwort für die Ubiquitinylierung von Rpb1 verantwortlich sind (Harreman *et al.*, 2009).

Bei einem Knockdown von Nedd4 durch transfizierte siRNA erfolgt der Abbau der Rpb1-Untereinheit durch das LACV-NSs-Protein nicht mehr so effizient wie in Zellen, in denen das Nedd4-Level normal ist (Abbildung 7.18). Weiterhin wird die Inhibition der IFN-Induktion um das 4,5-fache im Falle von IFN- β und um das 17-fache im Falle von ISG56 reduziert, wenn das Nedd4-Level durch einen Knockdown herunterreguliert ist (siehe Abbildung 7.19). Der Abbau von Rpb1 und somit die IFN-Inhibition werden jedoch nicht komplett aufgehoben. Das könnte daran liegen, dass der Abbau nicht nur durch eine Ubiquitin-E3-Ligase erfolgt, sondern durch mehrere, wie es auch in der DNA-Schadensantwort der Fall ist. Dies wird dadurch bekräftigt, dass Elongin C mit LACV-NSs interagiert und dadurch auch eine Rolle in dem Abbau von Rpb1 spielen könnte. Aus methodischen Gründen konnte nicht untersucht werden, ob ein Nedd4-Knockdown einen Einfluss auf die erhöhte Ubiquitinylierung durch das LACV-NSs-Protein hat, da beobachtet wurde, dass schon die Transfektion eine Ubiquitinylierung in Zellen induziert (Daten nicht gezeigt).

Es wurde weiterhin gezeigt, dass überexprimiertes Nedd4 durch das LACV-NSs-Protein relokalisiert wird: von einer homogenen Verteilung in nicht- oder in rLACVdelNSs-infizierten Zellen relokalisiert es in LACV WT-infizierten Zellen in perinukleäre Strukturen (siehe Abbildung 7.20). Unklar ist, welche anderen Proteine in diesen Strukturen vorhanden sein könnten. Eine Interaktion von Nedd4 mit LACV-NSs konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden (siehe Kapitel 7.3.2). Es ist somit unklar, von welchem Protein Nedd4 rekrutiert wird und warum es in die perinukleären Strukturen rekrutiert wird. Da gezeigt werden konnte, dass LACV-NSs mit Elongin C interagiert, wäre es denkbar, dass der Komplex aus LACV-NSs und Elongin C Nedd4 rekrutiert und die beiden Ubiquitin-E3-Ligasen dann die Ubiquitin-Ligation an Rpb1 katalysieren.

Das Tegumentprotein UL56 von Herpes-Simplex-Virus 2 (HSV2) interagiert mit Nedd4 (Ushijima *et al.*, 2008) und relokalisiert dieses (Ushijima *et al.*, 2009). Diese Relokalisation dient wahrscheinlich dazu, dass Virionen vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu der Plasmamembran transportiert werden und die Virionen so aus der Zelle ausgeschleust werden können. Dass es sich bei der Relokalisation von Nedd4 durch das LACV-NSs-Protein um eine solche Funktion handelt, kann für LACV ausgeschlossen werden, da die Relokalisation von Nedd4 von dem LACV-NSs-Protein abhängig ist. Dieses wiederum ist nicht involviert in die Maturation oder die Abknospung viraler Partikel.

8.2.1 Lokalisation des Abbaus von Rpb1

Wenn man davon ausgeht, dass in diesen perinukleären Strukturen eine Ubiquitylierung erfolgt (da eine Ligase-inaktive Form von Nedd4 nicht relokalisiert wird), die wichtig für den Abbau von Rpb1 ist, stellt sich die Frage der Lokalisation dieses Abbaus. Sowohl die elongierende Form der RNAPII als auch das NSs-Protein von LACV befinden sich im Zellkern (Verbruggen *et al.*, 2011; Young, 1991). Elongin C, das mit LACV-NSs interagiert, befindet sich normalerweise im Nukleolus, wird aber ebenso wie Nedd4 relokalisiert (unpublizierte Daten, Paul Verbruggen und Andreas Schön). Allerdings verschwindet in Immunfluoreszenz-Studien das Signal für Elongin C, wobei in der Western-Blot-Analyse gezeigt werden konnte, dass es nicht abgebaut wird (unpublizierte Daten, Paul Verbruggen und Andreas Schön). Wohin Elongin C relokalisiert wird, ist jedoch unklar. Man kann davon ausgehen, dass der Abbau der RNAPII im Kern erfolgt, da die hyperphosphorylierte Form der Rpb1-Untereinheit abgebaut wird und diese nur im Kern am Promoter des zu transkribierenden Gens vorzufinden ist. Hierfür könnte Elongin C aus den Nukleoli rekrutiert werden. Nedd4 hingegen müsste aus dem Zytoplasma in den Kern rekrutiert werden. Tatsächlich wurde von Hamilton *et al.* (2001) beschrieben, dass Nedd4 sich zwischen dem Kern und dem Zytoplasma bewegen kann und somit auch den Ubiquitin-abhängigen Abbau von nukleären Substraten katalysieren kann (Hamilton *et al.*, 2001). In den hier gezeigten Daten erkennt man jedoch, dass Nedd4 in perinukleären Strukturen akkumuliert. Weiterhin haben Fraktionierungsexperimente, in denen die zytoplasmatische Fraktion von der nukleären Fraktion getrennt wurde, ergeben, dass sich Nedd4 während der Infektion im Zytoplasma befindet (Daten nicht gezeigt). Da die Immunfluoreszenz-Analysen und auch die Fraktionierungsanalysen 16 h nach Infektion angefertigt worden sind und zudem Momentaufnahmen der Zellen sind, ist es möglich, dass eine eventuelle Lokalisation von Nedd4 in den Kern entweder früher stattfindet

oder die Menge des nukleär-lokalisierten Nedd4 unter der Nachweisgrenze liegt. Weiterhin spricht die nicht-nachweisbare Interaktion von Nedd4 mit LACV-NSs dafür, dass Nedd4 nur kurzzeitig in den Kern rekrutiert wird – eventuell durch ein Signal des LACV-NSs-Elongin C-Komplexes, der sich aufgrund der nukleären bzw. nukleolären Lokalisation der beiden Proteine ergeben könnte. Dafür spricht, dass Hamilton *et al.* berichten, dass Nedd4 über eine Rev-ähnliche Nukleus-Export-Sequenz verfügt, die eine prädominante zytoplasmatische Lokalisation sicherstellt (Hamilton *et al.*, 2001).

8.3 Ähnlichkeiten zwischen der DNA-Schadensantwort und der LACV-NSs-Wirkungsweise

In Verbruggen *et al.* (2011) wurde beschrieben, dass das LACV-NSs-Protein einen DNA-Schadensantwort-ähnlichen Abbau der RNAPII induziert. Bis dahin beobachtete Gemeinsamkeiten zwischen der DNA-Schadensantwort und der Wirkungsweise des LACV-NSs-Proteins sind die Hochregulation der pak6 mRNA, die Phosphorylierung des Histons H2AX und der Abbau der hyperphosphorylierten Form der Rpb1-Untereinheit der RNAPII (Verbruggen *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LACV-NSs eine Ubiquitinylierung von Rpb1 induziert, so dass Rpb1 über das Proteasom abgebaut werden kann. Weiterhin ist die Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 in diesen Abbau involviert, was wiederum Ähnlichkeiten zu der DNA-Schadensantwort aufzeigt. Auch die Interaktion von LACV-NSs mit Elongin C (unpublizierte Daten, Paul Verbruggen und Andreas Schön) spricht für eine Induktion eines DNA-Schadensantwort-ähnlichen Mechanismus durch LACV-NSs. Viele Viren induzieren eine der DNA-Schadensantwort ähnliche Reaktion, vor allem DNA-Viren und Retroviren (Bregnard *et al.*, 2014; Turnell & Grand, 2012). Für RNA-Viren ist eine Induktion einer solchen Reaktion bislang unbekannt – mit Ausnahme von LACV und, wie kürzlich publiziert wurde, RVFV (Baer *et al.*, 2012). Auch RVFV, welches ebenso wie LACV eine Inhibition der zellulären Transkription verursacht, induziert eine Phosphorylierung des Histons H2AX. Weiterhin werden ATM (ataxia-telangiectasia mutated), Chk2 (checkpoint kinase 2) und p53 phosphoryliert (Baer *et al.*, 2012). LACV hingegen induziert keine Phosphorylierung von p53 (Verbruggen *et al.*, 2011), allerdings könnte Chk auch eine Rolle in der durch LACV-NSs induzierten DNA-Schadensantwort-ähnlichen Reaktion spielen, da eine Behandlung von Zellen mit einem

Chk-Inhibitor (gegen Chk1 und Chk2) dazu führt, dass Rpb1 nicht effizient durch LACV-NSs abgebaut wird (siehe Abbildung 8.1). Interessanterweise wurde gezeigt, dass Koffein eine Transkriptions-Inhibition nach einem DNA-Schaden verhindert (Napolitano *et al.*, 2010). In einer anderen Studie wurden Larven von *Aedes albopictus*-Moskitos mit Koffein behandelt und man hat festgestellt, dass Koffein die LACV-Replikation in den Moskitos vermindert (Eastepe *et al.*, 2012). Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss einer Koffein-Behandlung auf den Rpb1-Abbau durch das LACV-NSs-Protein untersucht (siehe Abbildung 8.1).

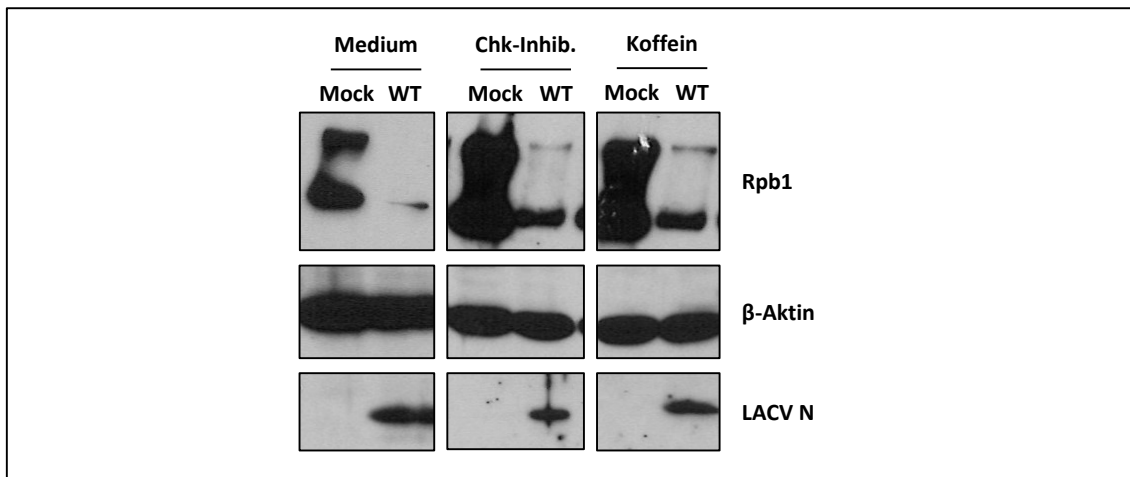


Abbildung 8.1: Einfluss einer Chk-Inhibition oder einer Koffein-Behandlung auf den Rpb1-Abbau durch LACV WT
HeLa-Zellen wurden entweder nicht behandelt (Medium) oder mit 0,05 μ M Chk-Protein-Inhibitor AZD7762 oder 2 mM Koffein 3 h vor Infektion behandelt. Dann wurden die Zellen entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 5 mit LACV WT (WT) infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen Rpb1, β -Aktin und LACV N analysiert.

8.4 Analyse der generellen Wirtszell-Antwort auf eine LACV-Infektion

Durch die Analyse der transkriptionellen Wirtszell-Antwort auf eine LACV-Infektion sollte untersucht werden, wie Zellen auf die Infektion mit LACV reagieren und ob LACV auch noch andere Mechanismen außer die DNA-Schadensantwort und das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert. Interessant ist, dass die Reaktion der Zellen auf den DNA-Interkalator Doxorubicin anders ist als die Reaktion der Zellen auf eine Infektion mit LACV WT oder rLACVdeINSs. Durch Doxorubicin werden hauptsächlich Gene herunterreguliert, die mit der Regulation der DNA-Synthese verknüpft sind oder mit der DNA interagieren (siehe Abbildung 7.23).

Aufgrund des fehlenden Virulenzfaktors induziert rLACVdelNSs in den Zellen eine starke IFN-Antwort (siehe Abbildung 7.22, Abbildung 7.24 und Abbildung 7.26). Es werden sowohl ISGs (Interferon-stimulierte Gene) als auch Transkriptionsfaktoren, Chemokine und Interleukine induziert.

Interessanterweise werden in einer LACV WT-Infektion alle Gene, die durch rLACVdelNSs hochreguliert werden, herunterreguliert (siehe 8.4.3). Andere Gene werden aber sehr wohl hochreguliert (siehe Abschnitt 8.4.1 und 8.4.2).

8.4.1 Mögliche Rolle der Phospholipase C, Acyl-CoA-Synthetase und des Myosins in einer LACV-Infektion

In der LACV WT-Infektion werden zwei Enzyme, die in der Synthese und Prozessierung von Fettsäuren und Phospholipiden wichtig sind, hochreguliert. Die Acyl-CoA-Synthetase (auch Thiokinase genannt) katalysiert die Aktivierung von Fettsäuren mit Coenzym A zu Acyl-CoA. Diese können dann durch die β -Oxidation abgebaut oder für die Synthese von Lipiden verwendet werden. Die Phospholipase C, Delta 4 hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Dies sind zwei wichtige Botenstoffe (*second messenger*) der Zelle. Es ist bekannt, dass Viren in den Fetthaushalt der Zelle eingreifen. So kann beispielsweise das 2A-Protein des Poliovirus die Aktivität der Acyl-CoA-Synthetase stimulieren, um vermehrt Fettsäuren für die Replikation zur Verfügung zu haben (Belov, 2014; Konan & Sanchez-Felipe, 2014; Nchoutmboube *et al.*, 2013). Auch Hepatitis-C-Virus (HCV) ist von der Fettsäuresynthese durch die Acyl-CoA-Synthetase abhängig (Kapadia & Chisari, 2005; Liefhebber *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das US28-Protein des humanen Cytomegalievirus (HCMV) die Phospholipase C aktiviert (Vomaske *et al.*, 2009). Auch das humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) aktiviert die Phospholipase C durch den Chemokin-ähnlichen Rezeptor HHV-8-GPCR (Couty & Gershengorn, 2004). HHV-8-GPCR-defiziente Viren können nicht replizieren, wenn Chemokine gegenwärtig sind und werden mit geringer Effizienz aus der Latenzphase reaktiviert (Couty & Gershengorn, 2004). Viele Viren, besonders RNA-Viren, bewirken die Bildung von Membranstrukturen in der Zelle, damit dort die Replikation und Transkription stattfinden kann (Knoops *et al.*, 2008; Overby & Weber, 2011). Auch Bunyaviren bilden Komplexe, in denen die Replikation stattfinden kann. Diese werden in perinukleären Regionen gebildet und induzieren die Rekrutierung von Mitochondrien zum Golgi-Apparat (Novoa *et al.*, 2005a; Salanueva *et al.*, 2003). Hier erfolgt die Zusammensetzung der Virionen. Dafür akkumulieren die

viralen Glykoproteine und verursachen eine Vakuolisierung. Vesikel, die Virionen enthalten, werden durch Exozytose zur Zelloberfläche gebracht und in den Zwischenzellraum freigesetzt. Es gibt zwei Arten von Exozytose: zum einen die konstitutive Exozytose und zum anderen die stimulierte Exozytose. Bei der stimulierten Exozytose sind Phospholipasen, die PIP_2 zu IP_3 und DAG spalten, involviert. Weiterhin ist in exozytotischen Prozessen auch ein Myosin 1g-Protein involviert (Maravillas-Montero *et al.*, 2014), dessen Verwandter (Myosin-IG) durch LACV WT in dem cDNA-Microarray hochreguliert wurde. Auch andere Myosin-Proteine sind an exozytotischen Vorgängen in der Zelle beteiligt (Munnich *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014). Myosine wiederum werden von vielen Viren benutzt, um die Sekretion von viralen Proteinen oder die Exozytose von Virionen zu steigern (Roberts & Baines, 2010). Auch die Aktivität der Phospholipase C während der Exozytose wird von Viren verwendet oder verändert (Soares, 2014; Vitale *et al.*, 2013). Es wäre denkbar, dass auch LACV die Phospholipase C, die Acyl-CoA-Synthetase und Myosine benutzt, um eine Exozytose von Virionen zu induzieren oder zu erhöhen. Unklar ist, warum die Hochregulation dieser Proteine in dem cDNA-Microarray nur in LACV WT-infizierten Zellen zu sehen ist. rLACVdeINs ist in der Lage, eine produktive Infektion in der Zelle zu etablieren und wird aus der Zelle per Exozytose ausgeschleust. Allerdings kann man beobachten, dass zum einen die Infektion von rLACVdeINs, unabhängig vom IFN-System, etwas langsamer verläuft als die von LACV WT, zum anderen sind die Titer des rLACVdeINs auch in IFN-defizienten Zellen etwas geringer als die von LACV WT. Insofern wäre denkbar, dass der Virulenzfaktor NSs auch hier eine Rolle spielt und als akzessorisches Protein Mechanismen reguliert oder in Gang setzt, die eine verbesserte Freisetzung von Virionen zur Folge haben. Untersuchen könnte man dies, indem man mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien analysiert, ob das Myosin-IG durch eine LACV-NSs-Expression relokalisiert wird oder beispielsweise an der Zelloberfläche akkumuliert. Von Vorteil wäre hier die Lebendzellmikroskopie, vor allem auch mit rekombinanten LACV, das innerhalb seines Genoms für ein Fluoreszenzprotein wie GFP (*green fluorescent protein*) oder mCherry kodiert. Für das Bunyamwera-Virus (BUNV) wurde gezeigt, dass ein Fluoreszenzprotein, welches an den N-Terminus eines verkürzten Gc-Proteins kloniert wurde, das Virus nicht in seiner Funktionsfähigkeit stört (Shi *et al.*, 2010). Derzeit gibt es rekombinante Rift-Valley-Fiebertypen, die für Flag-getaggt LACV-NSs kodieren. Würde man den Flag-Tag gegen ein Fluoreszenzprotein tauschen, so könnten auch mit diesen Viren Lebendzellmikroskopien durchgeführt werden. Weiterhin könnte man mit einem getaggt LACV-NSs-Protein Interaktionsstudien mit zum Beispiel Myosin-IG durchführen. Da Myosine Motorproteine sind, die sich an Aktinfilamenten entlang bewegen, wäre es auch interessant, den Aktinstatus der infizierten Zellen zu analysieren, vor allem da bekannt ist, dass sich viele Viren oder deren Ribonukleoproteinkomplexe

(RNPs) am Aktinzytoskelett entlang bewegen. Hierbei sollten immer LACV WT und rLACV Δ NSs parallel untersucht werden, um den Effekt des NSs-Proteins zu analysieren. Um zu ergründen, ob das LACV-NSs-Protein die Aktivität der Phospholipase C nutzt, könnte man beispielsweise die DAG-Produktion in LACV-infizierten Zellen messen (wie in Vitale *et al.*, 2013). Die Aktivität der Acyl-CoA-Synthetase und der Einfluss von LACV-NSs auf dieses Enzym und den Fetthaushalt der Zelle könnte man analysieren, indem man beispielsweise den Fettsäure-Import von Zellen wie in Nchoutmboube *et al.* (2013) untersucht.

8.4.2 Einfluss der 7SK-RNA in einer LACV-Infektion

Die cDNA-Microarray-Analyse hat ergeben, dass in LACV WT-infizierten Zellen die 7SK-RNA hochreguliert ist (siehe 7.5), die ein Regulator der RNAPII ist. Andere Viren, wie zum Beispiel das Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV) induzieren ebenso die 7SK-RNA, während beispielsweise ein Adenovirus (AdV) sie nicht induziert (siehe Abbildung 7.29). Neben der Induktion der 7SK-RNA haben LACV und VSV weiterhin die Gemeinsamkeit, die zelluläre Transkription zu inhibieren. Anders als LACV inhibiert VSV jedoch den Transkriptionsfaktor TFIID (Yuan *et al.*, 1998). RNAPII-Inhibitoren wie α -Amanitin, Doxorubicin oder Actinomycin D haben keinerlei Einfluss auf die Expression der 7SK-RNA, was deutlich macht, dass der hier gesehene Effekt LACV-NSs-spezifisch ist (siehe Abbildung 7.28).

Man könnte vermuten, dass eine Induktion der 7SK-RNA durch das LACV-NSs-Protein zur Folge hat, dass die Transkription, neben der generellen Inhibition durch den Rpb1-Abbau, zusätzlich noch durch das vermehrte Wirken der 7SK-RNA inhibiert wird. Es zeigte sich jedoch, dass ein Knockdown der 7SK-RNA keinerlei Einfluss auf die Inhibition der IFN-Induktion hat, da diese genauso effizient ist, wie in unbehandelten Zellen oder Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt wurden (siehe Abbildung 7.30). Weiterhin konnte man auch nur einen sehr geringen Effekt auf den Abbau der hyperphosphorylierten Bande (IIo) der Rpb1-Untereinheit beobachten (siehe Abbildung 8.2).

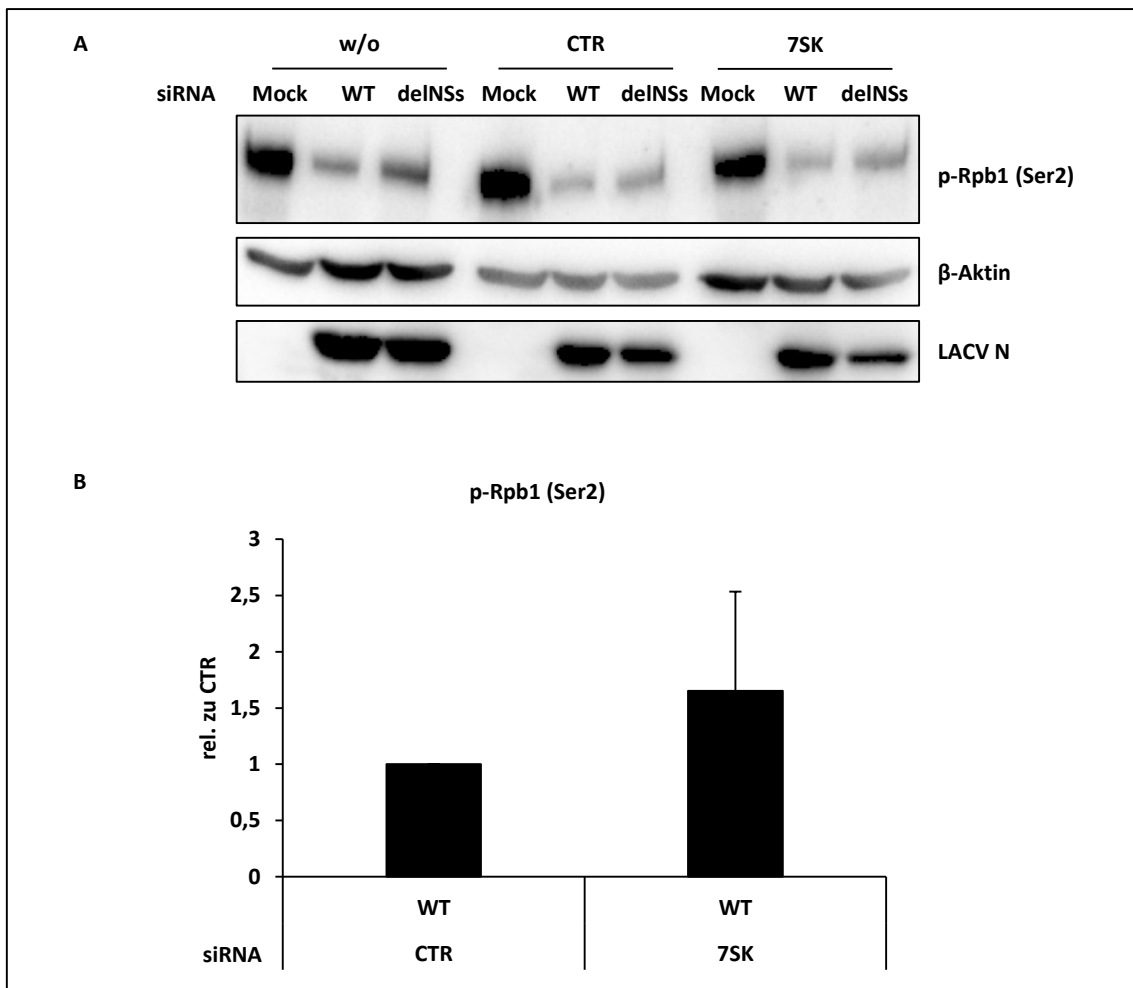


Abbildung 8.2: Effekt eines 7SK-RNA-Knockdowns auf den Abbau von Rpb1 durch LACV WT

A. A549-Zellen wurden entweder nicht behandelt (w/o), mit 50 nM Kontroll-siRNA (CTR) oder gegen 7SK-RNA transfiziert und 48 h lang inkubiert. Dann wurden die Zellen entweder nicht infiziert (Mock) oder mit einer MOI von 10 mit LACV WT (WT) oder rLACVdelNSs (delNSs) infiziert. 16 h p.i. wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Antikörpern gegen p-Rpb1 (Ser2), β-Aktin und LACV N analysiert. **B.** Quantifizierung des in **A.** gezeigten p-Rpb1 (Ser2)-Signals aus zwei unabhängigen Experimenten. Das p-Rpb1 (Ser2)-Signal wurde normalisiert auf das β-Aktin-Signal. w/o: *without*, CTR: Kontroll-siRNA.

Ein anderes Protein, das von der 7SK-RNA reguliert werden könnte, ist die Proteinkinase R (*protein kinase RNA-activated*, PKR). Es ist bekannt, dass PKR mit ncRNAs (*non-coding RNAs*) interagiert (Jeon *et al.*, 2012; Kunkeaw *et al.*, 2013; Launer-Felty & Cole, 2014; Lee *et al.*, 2011; Wahid *et al.*, 2009). So inhibiert beispielsweise die nicht-kodierende RNA nc886 PKR durch eine Kompetition mit doppel-strängiger (ds) RNA, die an PKR binden könnte (Jeon *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011). Weiterhin kann PKR durch regulatorische RNAs mit stark ausgebildeten Sekundärstrukturen aktiviert werden. Die Rolle, die die 7SK-RNA in der LACV-Infektion spielt, ist somit noch unklar. Dass die 7SK-RNA neben pTEFb auch noch andere Proteine reguliert, ist bekannt. So konnte zum Beispiel APOBEC3C, ein Deaminase-Enzym, als Interaktionspartner identifiziert wer-

den (He *et al.*, 2006). Die 7SK-RNA inhibiert die Aktivität von APOBEC3C, damit dieses keine zelluläre DNA deaminiert, und sequestriert es im Nukleolus (He *et al.*, 2006). Ob die 7SK-RNA eine Rolle in der Regulation eines Inhibitors von RNA-Viren (zum Beispiel OAS, Oligoadenylat-Synthetase) hat, ist unklar. Die Aktivität der 7SK-RNA in der Regulation von gleich zwei wichtigen nukleären Faktoren (pTEFb, APOBEC3C) impliziert eine generelle Rolle in der Regulation von nukleären Vorgängen. Da das LACV-NSs-Protein in eben diese Vorgänge eingreift (Abbau von RNAPII, mRNA-Export-Block; persönliche Mitteilung Simone Lau), könnte man hier einen Zusammenhang vermuten. Weiterhin könnte man vermuten, dass die 7SK-RNA an PKR bindet, vor allem weil bekannt ist, dass regulatorische RNAs an PKR binden können (Jeon *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2005). Ob diese Bindung an PKR einen IFN-induzierenden Effekt hat, da aktiviertes PKR den NF- κ B-Weg aktiviert, oder ob die Bindung eher inhibierend bzw. kompetitiv (zu zum Beispiel LACV-RNA) ist, muss noch analysiert werden.

8.4.3 Bewirkt LACV-NSs einen Abbau von Rpb1 an spezifischen Promotern der angeborenen Immunantwort?

In der cDNA-Microarray-Analyse ist aufgefallen, dass das NSs-Protein in LACV WT-infizierten Zellen zwar Proteine aus den verschiedensten Bereichen der Zelle hochreguliert (zum Beispiel Phospholipase C und Myosin), aber spezifisch Proteine herunterreguliert, die alle an der Immunantwort der Zelle beteiligt sind. Es ist bekannt, dass die RNAPII an bestimmten Genen schon assembliert ist und auch an Serin5 (Ser5) der CTD phosphoryliert ist (Brookes & Pombo, 2009; Guenther *et al.*, 2007; Muse *et al.*, 2007; Saunders *et al.*, 2006). Dies ist vor allem auch der Fall für Gene, die für Proteine der angeborenen Immunantwort kodieren (Hargreaves *et al.*, 2009). Hierbei sind auch die Histone schon so modifiziert, dass eine Transkription als Antwort auf einen Stimulus sofort stattfinden kann. Ein solcher Stimulus kann zum Beispiel ein Signal sein, das NF- κ B aktiviert, wodurch wiederum pTEFb rekrutiert wird (Hargreaves *et al.*, 2009). Weiterhin ist bekannt, dass das NSs-Protein von RVFV mit regulatorischen DNA-Sequenzen interagiert, die sich unter anderem auch in Genen befinden, die für Proteine der angeborenen Immunantwort kodieren (Benferhat *et al.*, 2012). Da LACV nach Eintreten in die Zelle RIG-I aktiviert (Weber *et al.*, 2013), könnte die Erkennung dieser Strukturen zu einer Aktivierung der Immunantwort über beispielsweise NF- κ B führen und dadurch die Transkription von ISGs induzieren. Diese wiederum könnten durch die schon assemblierte und an Ser5 phosphorylierte RNAPII schnell transkribiert

werden. Somit ist es durchaus denkbar, dass der durch das LACV-NSs-Protein induzierte RNAPII-Abbau deswegen zuerst diese RNAPIIs trifft, um eine IFN-Induktion zu inhibieren.

8.5 Ausblick

Der Einfluss des LACV-NSs-Proteins auf das Ubiquitin-Proteasom-System und der Beitrag der Ubiquitin-E3-Ligase Nedd4 für den Abbau der RNAPII konnte in dieser Arbeit erfolgreich aufgeklärt werden. Nun wäre es interessant zu analysieren, ob Nedd4 mit dem LACV-NSs-Interaktor Elongin C während der Infektion und in der Anwesenheit von LACV-NSs einen Komplex bildet. Weiterhin wäre eine genaue Aufschlüsselung der Rpb1-Ubiquitylierung interessant, das heißt ob diese, genau wie in der DNA-Schadensantwort, zuerst über Ubiquitin-K63-Verlinkungen erfolgt, dann abgebaut wird und dann zu Ubiquitin-K48-Ketten verknüpft wird.

Hinsichtlich des Einflusses von Nedd4 wäre eine Analyse der Involvierung von Bean1 interessant, da dieses Protein als Interaktor von Nedd4 bekannt ist und durch das LACV-NSs-Protein während einer Infektion hochreguliert wird (siehe cDNA-Microarray-Analyse).

Da die Lokalisation des Abbaus von Rpb1 derzeit noch unklar ist, könnte man dies vor allem mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen weitergehend untersuchen. Weil die hier gezeigten Immunfluoreszenz-Daten nur einen bestimmten Zeitpunkt repräsentieren, wäre die Lebendzell-Mikroskopie eine Methode, um sowohl die Infektion, die Lokalisation und den Transport von Proteinen und den Rpb1-Abbau zu analysieren.

Um weitere Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zwischen dem LACV-NSs-Effekt und der DNA-Schadensantwort aufzuschlüsseln, könnten Inhibitor-Experimente durchgeführt werden. Hier wurde schon der Einfluss von Inhibitoren von Chk2 und der Einfluss von Koffein gezeigt. Es hat sich herausgestellt, dass die Inhibition von Chk2 und die Gabe von Koffein den Rpb1-Abbau verlangsamt, ähnlich wie der Knockdown von Nedd4. Weiterführende Experimente könnten hier Gemeinsamkeiten, auch zu der durch RVFV-NSs-induzierten DNA-Schadensantwort, hervorheben.

Der Einfluss der LACV-NSs-stimulierten 7SK-RNA auf die LACV-Infektion, den Abbau von Rpb1 und auf die Aktivierung von PKR ist unklar. Hinsichtlich des Abbaus sollte der Einfluss der 7SK-RNA auf die Ser5-Phosphorylierung analysiert werden. Weiterhin müsste man den Zusammenhang zwischen der 7SK-RNA und der Aktivierung von PKR analysieren.

Obwohl das LACV-NSs-Protein bis jetzt als globaler Inhibitor der Transkription galt, deuten die Resultate der cDNA-Microarray-Analyse daraufhin, dass die RNAPII, die an einem Promoter eines Gens der angeborenen Immunantwort sitzt, spezifisch abgebaut wird. Mit Hilfe von beispielsweise ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) könnte man genauere Einblicke in den Abbau von Rpb1 an spezifischen Promotern erlangen.

Literaturverzeichnis

- Abbas, Y.M.**, Pichlmair, A., Gorna, M.W., Superti-Furga, G., & Nagar, B. 2013. Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. *Nature*, 494(7435), 60-64.
- Ablasser, A.**, Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K.A., & Hornung, V. 2009. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*, 10(10), 1065-1072.
- Afonso, A.**, Abrahantes, J.C., Conraths, F., Veldhuis, A., Elbers, A., Roberts, H., Van der Stede, Y., Meroc, E., Gache, K., & Richardson, J. 2014. The Schmallenberg virus epidemic in Europe-2011-2013. *Prev Vet Med*.
- Anan, T.**, Nagata, Y., Koga, H., Honda, Y., Yabuki, N., Miyamoto, C., Kuwano, A., Matsuda, I., Endo, F., Saya, H., & Nakao, M. 1998. Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells*, 3(11), 751-763.
- Anindya, R.**, Aygun, O., & Svejstrup, J.Q. 2007. Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Mol Cell*, 28(3), 386-397.
- Baer, A.**, Austin, D., Narayanan, A., Popova, T., Kainulainen, M., Bailey, C., Kashanchi, F., Weber, F., & Kehn-Hall, K. 2012. Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication. *J Biol Chem*, 287(10), 7399-7410.
- Barr, J.N.**, Elliott, R.M., Dunn, E.F., & Wertz, G.W. 2003. Segment-specific terminal sequences of Bunyamwera bunyavirus regulate genome replication. *Virology*, 311(2), 326-338.
- Barr, J.N.**, Rodgers, J.W., & Wertz, G.W. 2006. Identification of the Bunyamwera bunyavirus transcription termination signal. *J Gen Virol*, 87(Pt 1), 189-198.
- Barr, J.N.**, & Wertz, G.W. 2005. Role of the conserved nucleotide mismatch within 3'- and 5'-terminal regions of Bunyamwera virus in signaling transcription. *J Virol*, 79(6), 3586-3594.
- Barro, M.**, & Patton, J.T. 2007. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol*, 81(9), 4473-4481.
- Beaudenon, S.L.**, Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P., & Huibregtse, J.M. 1999. Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19(10), 6972-6979.
- Belgnaoui, S.M.**, Paz, S., & Hiscott, J. 2011. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol*, 23(5), 564-572.
- Bellocq, C.**, & Kolakofsky, D. 1987. Translational requirement for La Crosse virus S-mRNA synthesis: a possible mechanism. *J Virol*, 61(12), 3960-3967.
- Belov, G.A.** 2014. Modulation of lipid synthesis and trafficking pathways by picornaviruses. *Curr Opin Virol*, 9c, 19-23.
- Benferhat, R.**, Josse, T., Albaud, B., Gentien, D., Mansuroglu, Z., Marcato, V., Soues, S., Le Bonniec, B., Bouloy, M., & Bonnefoy, E. 2012. Large-scale chromatin immunoprecipitation with promoter sequence microarray analysis of the interaction of the NSs protein of Rift Valley fever virus with regulatory DNA regions of the host genome. *J Virol*, 86(20), 11333-11344.
- Bennett, R.S.**, Cress, C.M., Ward, J.M., Firestone, C.Y., Murphy, B.R., & Whitehead, S.S. 2008. La Crosse virus infectivity, pathogenesis, and immunogenicity in mice and monkeys. *Virol J*, 5, 25.
- Binder, M.**, Eberle, F., Seitz, S., Mucke, N., Huber, C.M., Kiani, N., Kaderali, L., Lohmann, V., Dalpke, A., & Bartenschlager, R. 2011. Molecular mechanism of signal perception and integration by the innate immune sensor retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I). *J Biol Chem*, 286(31), 27278-27287.

- Bird, G.,** Zorio, D.A., & Bentley, D.L. 2004. RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation. *Mol Cell Biol*, 24(20), 8963-8969.
- Blakqori, G.,** Delhay, S., Habjan, M., Blair, C.D., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E., Attarzadeh-Yazdi, G., Fragkoudis, R., Kohl, A., Kalinke, U., Weiss, S., Michiels, T., Staeheli, P., & Weber, F. 2007. La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. *J Virol*, 81(10), 4991-4999.
- Blakqori, G.,** Kochs, G., Haller, O., & Weber, F. 2003. Functional L polymerase of La Crosse virus allows in vivo reconstitution of recombinant nucleocapsids. *J Gen Virol*, 84(Pt 5), 1207-1214.
- Blakqori, G., Lowen, A.C., & Elliott, R.M. 2012. The small genome segment of Bunyamwera orthobunyavirus harbours a single transcription-termination signal. *J Gen Virol*, 93(Pt 7), 1449-1455.
- Blakqori, G.,** & Weber, F. 2005. Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. *J Virol*, 79(16), 10420-10428.
- Borucki, M.K.,** Kempf, B.J., Blitvich, B.J., Blair, C.D., & Beaty, B.J. 2002. La Crosse virus: replication in vertebrate and invertebrate hosts. In *Microbes Infect*. France, 341-350.
- Brass, V.,** Gosert, R., & Moradpour, D. 2009. Investigation of the hepatitis C virus replication complex. *Methods Mol Biol*, 510, 195-209.
- Bregnard, C.,** Benkirane, M., & Laguette, N. 2014. DNA damage repair machinery and HIV escape from innate immune sensing. *Front Microbiol*, 5, 176.
- Bres, V.,** Yoh, S.M., & Jones, K.A. 2008. The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol*, 20(3), 334-340.
- Bridgen, A., & Elliott, R.M.** 1996. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(26), 15400-15404.
- Bridgen, A.,** Weber, F., Fazakerley, J.K., & Elliott, R.M. 2001. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(2), 664-669.
- Brookes, E., & Pombo, A.** 2009. Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states. *EMBO Rep*, 10(11), 1213-1219.
- Brower, C.S.,** Sato, S., Tomomori-Sato, C., Kamura, T., Pause, A., Stearman, R., Klausner, R.D., Malik, S., Lane, W.S., Sorokina, I., Roeder, R.G., Conaway, J.W., & Conaway, R.C. 2002. Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16), 10353-10358.
- Cao, X.R.,** Lill, N.L., Boase, N., Shi, P.P., Croucher, D.R., Shan, H., Qu, J., Sweezer, E.M., Place, T., Kirby, P.A., Daly, R.J., Kumar, S., & Yang, B. 2008. Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling. *Sci Signal*, 1(38), ra5.
- Carlton-Smith, C., & Elliott, R.M.** 2012. Viperin, MTAP44, and protein kinase R contribute to the interferon-induced inhibition of Bunyamwera Orthobunyavirus replication. *J Virol*, 86(21), 11548-11557.
- Chang, A.,** Cheang, S., Espanel, X., & Sudol, M. 2000. Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem*, 275(27), 20562-20571.
- Chang, W.L.,** Barry, P.A., Szubin, R., Wang, D., & Baumgarth, N. 2009. Human cytomegalovirus suppresses type I interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells through its interleukin 10 homolog. *Virology*, 390(2), 330-337.
- Cheng, C., & Sharp, P.A.** 2003. RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes. *Mol Cell Biol*, 23(6), 1961-1967.
- Childs, K.,** Stock, N., Ross, C., Andrejeva, J., Hilton, L., Skinner, M., Randall, R., & Goodbourn, S. 2007. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology*, 359(1), 190-200.

- Colon-Ramos, D.A.,** Irusta, P.M., Gan, E.C., Olson, M.R., Song, J., Morimoto, R.I., Elliott, R.M., Lombard, M., Hollingsworth, R., Hardwick, J.M., Smith, G.K., & Kornbluth, S. 2003. Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Mol Biol Cell*, 14(10), 4162-4172.
- Couty, J.P., & Gershengorn, M.C.** 2004. Insights into the viral G protein-coupled receptor encoded by human herpesvirus type 8 (HHV-8). *Biol Cell*, 96(5), 349-354.
- Diamond, M.S., & Farzan, M.** 2013. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol*, 13(1), 46-57.
- Didcock, L.,** Young, D.F., Goodbourn, S., & Randall, R.E. 1999. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol*, 73(12), 9928-9933.
- Diribarne, G., & Bensaude, O.** 2009. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biol*, 6(2), 122-128.
- Elliott, R.M.** 1989a. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *Virology*, 173(2), 426-436.
- Elliott, R.M.** 1989b. Nucleotide sequence analysis of the small (S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *J Gen Virol*, 70 (Pt 5), 1281-1285.
- Endres, M.J.,** Jacoby, D.R., Janssen, R.S., Gonzalez-Scarano, F., & Nathanson, N. 1989. The large viral RNA segment of California serogroup bunyaviruses encodes the large viral protein. *J Gen Virol*, 70 (Pt 1), 223-228.
- Estep, N.E.,** Albert, R.E., & Anderson, J.R. 2012. Modulation of La Crosse Virus Infection in Aedes albopictus Mosquitoes Following Larval Exposure to Coffee Extracts. *Front Physiol*, 3, 66.
- Evans-Molina, C.,** Garmey, J.C., Ketchum, R., Brayman, K.L., Deng, S., & Mirmira, R.G. 2007. Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets. *Diabetes*, 56(3), 827-835.
- Finley, D.** 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 78, 477-513.
- Forster, F.,** Unverdorben, P., Sledz, P., & Baumeister, W. 2013. Unveiling the long-held secrets of the 26S proteasome. *Structure*, 21(9), 1551-1562.
- Fuller, F.,** Bhowan, A.S., & Bishop, D.H. 1983. Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSS, are coded by overlapping reading frames in the S RNA. *J Gen Virol*, 64 (Pt 8), 1705-1714.
- Galan, J.M., & Haguenuer-Tsapis, R.** 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo j*, 16(19), 5847-5854.
- Gardner, R.G.,** Nelson, Z.W., & Gottschling, D.E. 2005. Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell*, 120(6), 803-815.
- Gerhardt, R.R.,** Gottfried, K.L., Apperson, C.S., Davis, B.S., Erwin, P.C., Smith, A.B., Panella, N.A., Powell, E.E., & Nasci, R.S. 2001. First isolation of La Crosse virus from naturally infected Aedes albopictus. *Emerg Infect Dis*, 7(5), 807-811.
- Gomes, N.P.,** Bjerke, G., Llorente, B., Szostek, S.A., Emerson, B.M., & Espinosa, J.M. 2006. Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program. *Genes Dev*, 20(5), 601-612.
- Goodbourn, S., & Randall, R.E.** 2009. The regulation of type I interferon production by paramyxoviruses. *J Interferon Cytokine Res*, 29(9), 539-547.
- Grau-Bove, X.,** Sebe-Pedros, A., & Ruiz-Trillo, I. 2013. A genomic survey of HECT ubiquitin ligases in eukaryotes reveals independent expansions of the HECT system in several lineages. *Genome Biol Evol*, 5(5), 833-847.
- Grimstad, P.R.,** Kobayashi, J.F., Zhang, M.B., & Craig, G.B., Jr. 1989. Recently introduced Aedes albopictus in the United States: potential vector of La Crosse virus (Bunyaviridae: California serogroup). *J Am Mosq Control Assoc*, 5(3), 422-427.

- Guenther, M.G.**, Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., & Young, R.A. 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*, 130(1), 77-88.
- Habjan, M.**, Andersson, I., Klingstrom, J., Schumann, M., Martin, A., Zimmermann, P., Wagner, V., Pichlmair, A., Schneider, U., Muhlberger, E., Mirazimi, A., & Weber, F. 2008. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One*, 3(4), e2032.
- Habjan, M.**, Hubel, P., Lacerda, L., Benda, C., Holze, C., Eberl, C.H., Mann, A., Kindler, E., Gil-Cruz, C., Ziebuhr, J., Thiel, V., & Pichlmair, A. 2013. Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'O-unmethylated capped RNA. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003663.
- Hacker, D.**, Raju, R., & Kolakofsky, D. 1989. La Crosse virus nucleocapsid protein controls its own synthesis in mosquito cells by encapsidating its mRNA. *J Virol*, 63(12), 5166-5174.
- Haddow, A.D., & Odoi, A.** 2009. The incidence risk, clustering, and clinical presentation of La Crosse virus infections in the eastern United States, 2003-2007. *PLoS One*, 4(7), e6145.
- Hahn, S.** 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 11(5), 394-403.
- Haller, O.**, Kochs, G., & Weber, F. 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, 344(1), 119-130.
- Hamilton, M.H.**, Tcherepanova, I., Huibregtse, J.M., & McDonnell, D.P. 2001. Nuclear import/export of hRPF1/Nedd4 regulates the ubiquitin-dependent degradation of its nuclear substrates. *J Biol Chem*, 276(28), 26324-26331.
- Hargreaves, D.C.**, Horng, T., & Medzhitov, R. 2009. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell*, 138(1), 129-145.
- Harreman, M.**, Taschner, M., Sigurdsson, S., Anindya, R., Reid, J., Somesh, B., Kong, S.E., Banks, C.A., Conaway, R.C., Conaway, J.W., & Svejstrup, J.Q. 2009. Distinct ubiquitin ligases act sequentially for RNA polymerase II polyubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(49), 20705-20710.
- Harty, R.N.**, Brown, M.E., Wang, G., Huibregtse, J., & Hayes, F.P. 2000. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13871-13876.
- He, W.J.**, Chen, R., Yang, Z., & Zhou, Q. 2006. Regulation of two key nuclear enzymatic activities by the 7SK small nuclear RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71, 301-311.
- Heride, C.**, Urbe, S., & Clague, M.J. 2014. Ubiquitin code assembly and disassembly. *Curr Biol*, 24(6), R215-220.
- Hirose, Y., & Ohkuma, Y.** 2007. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J Biochem*, 141(5), 601-608.
- Hjerpe, R.**, Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P., & Rodriguez, M.S. 2009. Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep*, 10(11), 1250-1258.
- Hollidge, B.S.**, Gonzalez-Scarano, F., & Soldan, S.S. 2010. Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5(3), 428-442.
- Hornung, V.**, Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 314(5801), 994-997.
- Hou, F.**, Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q.X., & Chen, Z.J. 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*, 146(3), 448-461.
- Huibregtse, J.M.**, Yang, J.C., & Beaudenon, S.L. 1997. The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8), 3656-3661.

- Jackson, B.T.**, Brewster, C.C., & Paulson, S.L. 2012. La Crosse virus infection alters blood feeding behavior in *Aedes triseriatus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 49(6), 1424-1429.
- Jeon, S.H.**, Lee, K., Lee, K.S., Kunkeaw, N., Johnson, B.H., Holthauzen, L.M., Gong, B., Leelayuwat, C., & Lee, Y.S. 2012. Characterization of the direct physical interaction of nc886, a cellular non-coding RNA, and PKR. *FEBS Lett*, 586(19), 3477-3484.
- Kainulainen, M.**, Habjan, M., Hubel, P., Busch, L., Lau, S., Colinge, J., Superti-Furga, G., Pichlmair, A., & Weber, F. 2014. Virulence factor NSs of rift valley fever virus recruits the F-box protein FBXO3 to degrade subunit p62 of general transcription factor TFIIF. *J Virol*, 88(6), 3464-3473.
- Kalveram, B.**, Lihoradova, O., & Ikegami, T. 2011. NSs protein of rift valley fever virus promotes posttranslational downregulation of the TFIIF subunit p62. *J Virol*, 85(13), 6234-6243.
- Kapadia, S.B.**, & **Chisari, F.V.** 2005. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(7), 2561-2566.
- Kato, H.**, Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., & Akira, S. 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, 205(7), 1601-1610.
- Kawasaki, T.**, Kawai, T., & Akira, S. 2011. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol Rev*, 243(1), 61-73.
- Kim, W.**, Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., & Gygi, S.P. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell*, 44(2), 325-340.
- Knoops, K.**, Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., & Snijder, E.J. 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol*, 6(9), e226.
- Kochs, G.**, Janzen, C., Hohenberg, H., & Haller, O. 2002. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 3153-3158.
- Kohl, A.**, Dunn, E.F., Lowen, A.C., & Elliott, R.M. 2004. Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. *J Gen Virol*, 85(Pt 11), 3269-3278.
- Kohl, A.**, Lowen, A.C., Leonard, V.H., & Elliott, R.M. 2006. Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome. *J Gen Virol*, 87(Pt 1), 177-187.
- Komander, D.**, & **Rape, M.** 2012. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*, 81, 203-229.
- Komarnitsky, P.**, Cho, E.J., & Buratowski, S. 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev*, 14(19), 2452-2460.
- Konan, K.V.**, & **Sanchez-Felipe, L.** 2014. Lipids and RNA virus replication. *Curr Opin Virol*, 9c, 45-52.
- Kong, S.E.**, Kobor, M.S., Krogan, N.J., Somesh, B.P., Sogaard, T.M., Greenblatt, J.F., & Svejstrup, J.Q. 2005. Interaction of Fcp1 phosphatase with elongating RNA polymerase II holoenzyme, enzymatic mechanism of action, and genetic interaction with elongator. *J Biol Chem*, 280(6), 4299-4306.
- Kuismanen, E.**, Hedman, K., Saraste, J., & Pettersson, R.F. 1982. Uukuniemi virus maturation: accumulation of virus particles and viral antigens in the Golgi complex. *Mol Cell Biol*, 2(11), 1444-1458.
- Kunkeaw, N.**, Jeon, S.H., Lee, K., Johnson, B.H., Tanasanvimon, S., Javle, M., Pairojkul, C., Chamgramol, Y., Wongfieng, W., Gong, B., Leelayuwat, C., & Lee, Y.S. 2013. Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene*, 32(32), 3722-3731.

- Launer-Felty, K., & Cole, J.L.** 2014. Domain interactions in adenovirus VAI RNA mediate high-affinity PKR binding. *J Mol Biol*, 426(6), 1285-1295.
- Le May, N.,** Dubaele, S., Proietti De Santis, L., Billecocq, A., Bouloy, M., & Egly, J.M. 2004. TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell*, 116(4), 541-550.
- Le May, N.,** Mansuroglu, Z., Leger, P., Josse, T., Blot, G., Billecocq, A., Flick, R., Jacob, Y., Bonnefoy, E., & Bouloy, M. 2008. A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells. *PLoS Pathog*, 4(1), e13.
- Lee, K.,** Kunkeaw, N., Jeon, S.H., Lee, I., Johnson, B.H., Kang, G.Y., Bang, J.Y., Park, H.S., Leelayuwat, C., & Lee, Y.S. 2011. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *Rna*, 17(6), 1076-1089.
- Lees, J.F.,** Pringle, C.R., & Elliott, R.M. 1986. Nucleotide sequence of the Bunyamwera virus M RNA segment: conservation of structural features in the Bunyavirus glycoprotein gene product. *Virology*, 148(1), 1-14.
- Leonard, V.H.,** Kohl, A., Hart, T.J., & Elliott, R.M. 2006. Interaction of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *J Virol*, 80(19), 9667-9675.
- Levy, D.E.,** Marie, I.J., & Durbin, J.E. 2011. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol*, 1(6), 476-486.
- Li, K.,** Foy, E., Ferreón, J.C., Nakamura, M., Ferreón, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr., & Lemon, S.M. 2005a. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8), 2992-2997.
- Li, X.D.,** Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., & Chen, Z.J. 2005b. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49), 17717-17722.
- Liefhebber, J.M.,** Hague, C.V., Zhang, Q., Wakelam, M.J., & McLauchlan, J. 2014. Modulation of triglyceride and cholesterol ester synthesis impairs assembly of infectious hepatitis C virus. *J Biol Chem*, 289(31), 21276-21288.
- Lozach, P.Y.,** Kuhbacher, A., Meier, R., Mancini, R., Bitto, D., Bouloy, M., & Helenius, A. 2011. DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe*, 10(1), 75-88.
- Maravillas-Montero, J.L.,** Lopez-Ortega, O., Patino-Lopez, G., & Santos-Argumedo, L. 2014. Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and endocytosis in B lymphocytes. *Eur J Immunol*, 44(3), 877-886.
- Mardani, M.,** Keshtkar-Jahromi, M., Ataie, B., & Adibi, P. 2009. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus as a nosocomial pathogen in Iran. *Am J Trop Med Hyg*, 81(4), 675-678.
- Mibayashi, M.,** Martinez-Sobrido, L., Loo, Y.M., Cardenas, W.B., Gale, M., Jr., & Garcia-Sastre, A. 2007. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, 81(2), 514-524.
- Moore, C.G., & Mitchell, C.J.** 1997. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis*, 3(3), 329-334.
- Mosley, A.L.,** Pattenden, S.G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J.M., Florens, L., Workman, J.L., & Washburn, M.P. 2009. Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Mol Cell*, 34(2), 168-178.
- Mukherjee, P.,** Woods, T.A., Moore, R.A., & Peterson, K.E. 2013. Activation of the innate signaling molecule MAVS by bunyavirus infection upregulates the adaptor protein SARM1, leading to neuronal death. *Immunity*, 38(4), 705-716.
- Munnich, S.,** Taft, M.H., & Manstein, D.J. 2014. Crystal structure of human myosin 1c--the motor in GLUT4 exocytosis: implications for Ca²⁺ regulation and 14-3-3 binding. *J Mol Biol*, 426(10), 2070-2081.
- Muse, G.W.,** Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., & Adelman, K. 2007. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet*, 39(12), 1507-1511.

- Myskiw, C.**, Arsenio, J., van Bruggen, R., Deschambault, Y., & Cao, J. 2009. Vaccinia virus E3 suppresses expression of diverse cytokines through inhibition of the PKR, NF-kappaB, and IRF3 pathways. *J Virol*, 83(13), 6757-6768.
- Napolitano, G.**, Amente, S., Castiglia, V., Gargano, B., Ruda, V., Darzacq, X., Bensaude, O., Majello, B., & Lania, L. 2010. Caffeine prevents transcription inhibition and P-TEFb/7SK dissociation following UV-induced DNA damage. *PLoS One*, 5(6), e11245.
- Napolitano, G.**, Lania, L., & Majello, B. 2014. RNA polymerase II CTD modifications: how many tales from a single tail. *J Cell Physiol*, 229(5), 538-544.
- Nchoutmboube, J.A.**, Viktorova, E.G., Scott, A.J., Ford, L.A., Pei, Z., Watkins, P.A., Ernst, R.K., & Belov, G.A. 2013. Increased long chain acyl-CoA synthetase activity and fatty acid import is linked to membrane synthesis for development of picornavirus replication organelles. *PLoS Pathog*, 9(6), e1003401.
- Novoa, R.R.**, Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., & Risco, C. 2005a. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell*, 97(2), 147-172.
- Novoa, R.R.**, Calderita, G., Cabezas, P., Elliott, R.M., & Risco, C. 2005b. Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus. *J Virol*, 79(17), 10852-10863.
- Novoselova, T.V.**, Rose, R.S., Marks, H.M., & Sullivan, J.A. 2013. SUMOylation regulates the homologous to E6-AP carboxyl terminus (HECT) ubiquitin ligase Rsp5p. *J Biol Chem*, 288(15), 10308-10317.
- Osborne, J.C.**, & Elliott, R.M. 2000. RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. *J Virol*, 74(21), 9946-9952.
- Oudshoorn, D.**, Versteeg, G.A., & Kikkert, M. 2012. Regulation of the innate immune system by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Cytokine Growth Factor Rev*, 23(6), 273-282.
- Overby, A.K.**, & Weber, F. 2011. Hiding from intracellular pattern recognition receptors, a passive strategy of flavivirus immune evasion. *Virulence*, 2(3), 238-240.
- Padula, P.J.**, Edelstein, A., Miguel, S.D., Lopez, N.M., Rossi, C.M., & Rabinovich, R.D. 1998. [Epidemic outbreak of Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Molecular evidence of person to person transmission of Andes virus]. *Medicina (B Aires)*, 58 Suppl 1, 27-36.
- Patterson, J.L.**, Holloway, B., & Kolakofsky, D. 1984. La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J Virol*, 52(1), 215-222.
- Pavlovic, J.**, Schultz, J., Hefti, H.P., Schuh, T., & Molling, K. 2000. DNA vaccination against La Crosse virus. *Intervirology*, 43(4-6), 312-321.
- Perrett, C.A.**, Lin, D.Y., & Zhou, D. 2011. Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Front Microbiol*, 2, 143.
- Persaud, A.**, Alberts, P., Mari, S., Tong, J., Murchie, R., Maspero, E., Safi, F., Moran, M.F., Polo, S., & Rotin, D. 2014. Tyrosine phosphorylation of NEDD4 activates its ubiquitin ligase activity. *Sci Signal*, 7(346), ra95.
- Pfaller, C.K.**, & Conzelmann, K.K. 2008. Measles virus V protein is a decoy substrate for IkappaB kinase alpha and prevents Toll-like receptor 7/9-mediated interferon induction. *J Virol*, 82(24), 12365-12373.
- Pichlmair, A.**, Lassnig, C., Eberle, C.A., Gorna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Burckstummer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L., Rulicke, T., Weber, F., Colinge, J., Muller, M., & Superti-Furga, G. 2011. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat Immunol*, 12(7), 624-630.
- Pichlmair, A.**, Schulz, O., Tan, C.P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., & Reis e Sousa, C. 2009. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol*, 83(20), 10761-10769.
- Pickart, C.M.** 1997. Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb j*, 11(13), 1055-1066.

- Plotch, S.J.,** Bouloy, M., Ulmanen, I., & Krug, R.M. 1981. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, 23(3), 847-858.
- Poss, Z.C.,** Ebmeier, C.C., & Taatjes, D.J. 2013. The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(6), 575-608.
- Querido, E.,** Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., & Branton, P.E. 2001. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev*, 15(23), 3104-3117.
- Randall, R.E., & Goodbourn, S.** 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, 89(Pt 1), 1-47.
- Reese, S.M.,** Beaty, M.K., Gabitzsch, E.S., Blair, C.D., & Beaty, B.J. 2009. *Aedes triseriatus* females transovarially infected with La Crosse virus mate more efficiently than uninfected mosquitoes. *J Med Entomol*, 46(5), 1152-1158.
- Reguera, J.,** Weber, F., & Cusack, S. 2010. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog*, 6(9), e1001101.
- Reyes-Reyes, M., & Hampsey, M.** 2007. Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation. *Mol Cell Biol*, 27(3), 926-936.
- Ribar, B.,** Prakash, L., & Prakash, S. 2006. Requirement of ELC1 for RNA polymerase II polyubiquitylation and degradation in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 26(11), 3999-4005.
- Roberts, K.L., & Baines, J.D.** 2010. Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins. *J Virol*, 84(19), 9889-9896.
- Rotin, D., & Kumar, S.** 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(6), 398-409.
- Saeki, Y.,** Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., & Tanaka, K. 2009. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *Embo j*, 28(4), 359-371.
- Salanueva, I.J.,** Novoa, R.R., Cabezas, P., Lopez-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Elliott, R.M., & Risco, C. 2003. Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol*, 77(2), 1368-1381.
- Saunders, A.,** Core, L.J., & Lis, J.T. 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 557-567.
- Sette, P.,** Jadwin, J.A., Dussupt, V., Bello, N.F., & Bouamr, F. 2010. The ESCRT-associated protein Alix recruits the ubiquitin ligase Nedd4-1 to facilitate HIV-1 release through the LYPXnL domain motif. *J Virol*, 84(16), 8181-8192.
- Shcherbik, N.,** Kumar, S., & Haines, D.S. 2002. Substrate proteolysis is inhibited by dominant-negative Nedd4 and Rsp5 mutants harboring alterations in WW domain 1. *J Cell Sci*, 115(Pt 5), 1041-1048.
- Shi, X.,** Kohl, A., Leonard, V.H., Li, P., McLees, A., & Elliott, R.M. 2006. Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol*, 80(16), 8089-8099.
- Shi, X.,** Kohl, A., Li, P., & Elliott, R.M. 2007. Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *J Virol*, 81(18), 10151-10160.
- Shi, X.,** van Mierlo, J.T., French, A., & Elliott, R.M. 2010. Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein. *J Virol*, 84(17), 8460-8469.
- Soares, H.** 2014. HIV-1 Intersection with CD4 T Cell Vesicle Exocytosis: Intercellular Communication Goes Viral. *Front Immunol*, 5, 454.

- Somesh, B.P.**, Sigurdsson, S., Saeki, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Svejstrup, J.Q. 2007. Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD. *Cell*, 129(1), 57-68.
- Strack, B.**, Calistri, A., Accola, M.A., Palu, G., & Gottlinger, H.G. 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24), 13063-13068.
- Sun, J.**, Keim, C.D., Wang, J., Kazadi, D., Oliver, P.M., Rabadan, R., & Basu, U. 2013. E3-ubiquitin ligase Nedd4 determines the fate of AID-associated RNA polymerase II in B cells. *Genes Dev*, 27(16), 1821-1833.
- Sun, Y.**, Chiu, T.T., Foley, K.P., Bilan, P.J., & Klip, A. 2014. Myosin Va mediates Rab8A-regulated GLUT4 vesicle exocytosis in insulin-stimulated muscle cells. *Mol Biol Cell*, 25(7), 1159-1170.
- Svejstrup, J.Q.** 2007. Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem Sci*, 32(4), 165-171.
- Taylor, K.G.**, Woods, T.A., Winkler, C.W., Carmody, A.B., & Peterson, K.E. 2014. Age-dependent myeloid dendritic cell responses mediate resistance to la crosse virus-induced neurological disease. *J Virol*, 88(19), 11070-11079.
- Terrell, J.**, Shih, S., Dunn, R., & Hicke, L. 1998. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell*, 1(2), 193-202.
- Thomas, D.**, Blakqori, G., Wagner, V., Banholzer, M., Kessler, N., Elliott, R.M., Haller, O., & Weber, F. 2004. Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem*, 279(30), 31471-31477.
- Thomas, M.C., & Chiang, C.M.** 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41(3), 105-178.
- Thompson, W.H., & Beaty, B.J.** 1977. Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science*, 196(4289), 530-531.
- Thompson, W.H.**, Kalfayan, B., & Anslow, R.O. 1965. Isolation of California Encephalitis Group Virus from a fatal human illness. *Am J Epidemiol*, 81, 245-253.
- Thrower, J.S.**, Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C.M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo j*, 19(1), 94-102.
- Timmins, J.**, Schoehn, G., Ricard-Blum, S., Scianimanico, S., Vernet, T., Ruigrok, R.W., & Weissenhorn, W. 2003. Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol*, 326(2), 493-502.
- Tofaris, G.K.**, Kim, H.T., Hourez, R., Jung, J.W., Kim, K.P., & Goldberg, A.L. 2011. Ubiquitin ligase Nedd4 promotes alpha-synuclein degradation by the endosomal-lysosomal pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(41), 17004-17009.
- Turnell, A.S., & Grand, R.J.** 2012. DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *J Gen Virol*, 93(Pt 10), 2076-2097.
- Ulane, C.M., & Horvath, C.M.** 2002. Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components. *Virology*, 304(2), 160-166.
- Ushijima, Y.**, Goshima, F., Kimura, H., & Nishiyama, Y. 2009. Herpes simplex virus type 2 tegument protein UL56 relocates ubiquitin ligase Nedd4 and has a role in transport and/or release of virions. *Virol J*, 6, 168.
- Ushijima, Y.**, Koshizuka, T., Goshima, F., Kimura, H., & Nishiyama, Y. 2008. Herpes simplex virus type 2 UL56 interacts with the ubiquitin ligase Nedd4 and increases its ubiquitination. *J Virol*, 82(11), 5220-5233.
- Verbruggen, P.**, Ruf, M., Blakqori, G., Overby, A.K., Heidemann, M., Eick, D., & Weber, F. 2011. Interferon antagonist NSs of La Crosse virus triggers a DNA damage response-like degradation of transcribing RNA polymerase II. *J Biol Chem*, 286(5), 3681-3692.
- Vialat, P., & Bouloy, M.** 1992. Germiston virus transcriptase requires active 40S ribosomal subunits and utilizes capped cellular RNAs. *J Virol*, 66(2), 685-693.

- Vitale, N.**, Beaumelle, B., Bader, M.F., & Tryoen-Toth, P. 2013. HIV-1 Tat protein perturbs diacylglycerol production at the plasma membrane of neurosecretory cells during exocytosis. *Commun Integr Biol*, 6(5), e25145.
- Vomaske, J.**, Nelson, J.A., & Streblow, D.N. 2009. Human Cytomegalovirus US28: a functionally selective chemokine binding receptor. *Infect Disord Drug Targets*, 9(5), 548-556.
- Wada, T.**, Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., & Handa, H. 1998. Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *Embo j*, 17(24), 7395-7403.
- Wahid, A.M.**, Coventry, V.K., & Conn, G.L. 2009. The PKR-binding domain of adenovirus VA RNAI exists as a mixture of two functionally non-equivalent structures. *Nucleic Acids Res*, 37(17), 5830-5837.
- Wang, F.**, Barrett, J.W., Shao, Q., Gao, X., Dekaban, G.A., & McFadden, G. 2009. Myxoma virus selectively disrupts type I interferon signaling in primary human fibroblasts by blocking the activation of the Janus kinase Tyk2. *Virology*, 387(1), 136-146.
- Wang, J.**, Peng, Q., Lin, Q., Childress, C., Carey, D., & Yang, W. 2010. Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition. *J Biol Chem*, 285(16), 12279-12288.
- Watanabe, M.A.**, de Souza, L.R., Murad, J.M., & De Lucca, F.L. 2005. Activation of the RNA-dependent protein kinase (PKR) of lymphocytes by regulatory RNAs: implications for immunomodulation in HIV infection. *Curr HIV Res*, 3(4), 329-337.
- Weber, F.**, Bridgen, A., Fazakerley, J.K., Streitenfeld, H., Kessler, N., Randall, R.E., & Elliott, R.M. 2002. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. *J Virol*, 76(16), 7949-7955.
- Weber, F.**, Dunn, E.F., Bridgen, A., & Elliott, R.M. 2001. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology*, 281(1), 67-74.
- Weber, F.**, Wagner, V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R., & Paludan, S.R. 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 80(10), 5059-5064.
- Weber, M.**, Gawanbacht, A., Habjan, M., Rang, A., Borner, C., Schmidt, A.M., Veitinger, S., Jacob, R., Devignot, S., Kochs, G., Garcia-Sastre, A., & Weber, F. 2013. Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe*, 13(3), 336-346.
- Weber, M.**, & **Weber, F.** 2014a. RIG-I-like receptors and negative-strand RNA viruses: RLRly bird catches some worms. *Cytokine Growth Factor Rev*.
- Weber, M.**, & **Weber, F.** 2014b. Segmented negative-strand RNA viruses and RIG-I: divide (your genome) and rule. *Curr Opin Microbiol*, 20, 96-102.
- Xu, M.**, Skaug, B., Zeng, W., & Chen, Z.J. 2009. A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Mol Cell*, 36(2), 302-314.
- Yang, B.**, & **Kumar, S.** 2010. Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ*, 17(1), 68-77.
- Yasuda, J.**, Nakao, M., Kawaoka, Y., & Shida, H. 2003. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J Virol*, 77(18), 9987-9992.
- Yasukawa, T.**, Kamura, T., Kitajima, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., & Aso, T. 2008. Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. *Embo j*, 27(24), 3256-3266.
- Yoneyama, M.**, & **Fujita, T.** 2010. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol*, 20(1), 4-22.
- Young, R.A.** 1991. RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, 60, 689-715.
- Yu, X.**, Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., & Yu, X.F. 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, 302(5647), 1056-1060.

Yuan, H., Yoza, B.K., & Lyles, D.S. 1998. Inhibition of host RNA polymerase II-dependent transcription by vesicular stomatitis virus results from inactivation of TFIID. *Virology*, 251(2), 383-392.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| AdV | Adenovirus |
| AF | Afrika |
| ANDV | Andes-Virus |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Arbovirus | <i>Arthropode-borne virus</i> |
| AS | Asien |
| ATM | <i>Ataxia-telangiectasia mutated</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AU | Australien |
| Bean1 | <i>Brain expressed, associated with Nedd4, 1</i> |
| BHK | <i>Baby hamster kidney</i> |
| bp | Basenpaar |
| BPB | Bromphenolblau |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BUNV | Bunyamwera-Virus |
| CCHFV | <i>Crimean-Congo-hemorrhagic-fever-virus</i> |
| CDK7/9 | <i>Cyclin-dependent kinase 7/9</i> |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> |
| ChIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| Chk2 | <i>Checkpoint kinase 2</i> |
| CHX | Cycloheximid |
| CPE | <i>Cytopathic effect</i> |
| cRNA | <i>Copy RNA</i> |
| CTD | C-terminale Domäne |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| CTR | <i>Control</i> |
| CXCL10 | <i>C-X-C motif chemokine 10</i> |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid |
| DC-SIGN | <i>Dendritic-cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin</i> |
| DDR | <i>DNA damage response</i> |
| DEAE-Dextran | Diethylaminoethyl-Dextran |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |

| | |
|-----------------|--|
| DoxR | Doxorubicin |
| ds | Doppelsträngig |
| DSIF | <i>DRB-sensitivity inducing complex</i> |
| DUB | De-ubiquitinylierendes Enzym |
| E6AP | <i>Human papilloma virus E6-associated protein</i> |
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> |
| (e)GFP | <i>(Enhanced) green fluorescent protein</i> |
| eIF2 α | Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 α |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| EU | Europa |
| FBXO3 | F-Box-Protein 3 |
| Fcp1 | <i>F-cell production 1</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| HA | Hämagglutinin |
| HCMV | Humanes Cytomegalievirus |
| HCV | Hepatitis-C-Virus |
| HECT | <i>Homologous to the E6-AP carboxyl terminus</i> |
| HeLa | Henrietta Lacks |
| HEXIM1/2 | <i>Hexamethylene bisacetamide (HMBA)-induced mRNA 1/2</i> |
| HFRS | <i>Hemorrhagic fever with renal syndrome</i> |
| HHV-8 | Humanes Herpesvirus Typ 8 |
| hnRNPs | heterogene Ribonukleoproteinkomplexe |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HPS | Hantavirus-pulmonales Syndrom |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HSV | Herpes-Simplex-Virus |
| IFIT | <i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i> |
| IFN | Interferon |
| IFNAR | Interferon- α/β -Rezeptor |
| IH | Iberische Halbinsel |
| IL | Interleukin |
| IP-10 | <i>10 kDa interferon-γ-induced protein 10</i> |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-Trisphosphat |
| IPS-1 | <i>Interferon-β promoter stimulator protein-1</i> |
| IRF-3 | <i>Interferon regulatory factor-3</i> |
| ISG | Interferon-stimuliertes Gen |
| I κ B | <i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i> |
| kb | Kilobasen |

| | |
|------------------|---|
| LACV | La Crosse-Virus |
| LGP2 | <i>Laboratory of genetics and physiology 2</i> |
| Lys oder K | Lysin |
| MAVS | <i>Mitochondrial antiviral-signalling protein</i> |
| MDA5 | <i>Melanoma differentiation-associated factor 5</i> |
| mDC | <i>Myeloid dendritic cell</i> |
| Med8 | <i>Mediator complex subunit 8</i> |
| MEF | <i>Mouse embryonic fibroblast</i> |
| min | Minuten |
| miRNA | <i>Micro RNA</i> |
| MOI | <i>Multiplicity of infection</i> |
| MOPS | <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> |
| MyD88 | <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> |
| NA | Nordamerika |
| ncRNA | <i>Non-coding RNA</i> |
| Nedd4 | <i>Neural precursor cell-expressed developmentally down regulated 4</i> |
| NELF | <i>Negative-acting elongation factor complex</i> |
| NER | Nukleotidexzisions-Reparatur |
| NF- κ B | <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i> |
| NSm | <i>Non-structural protein encoded on the M segment</i> |
| NSs | <i>Non-structural protein encoded on the S segment</i> |
| nt | Nukleotid |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| OAS | Oligoadenylat-Synthetase |
| OD | Optische Dichte |
| OE | Osteuropa |
| p.i. | <i>Post infection</i> |
| p.t. | <i>Post transfection</i> |
| PABP | PolyA-bindendes Protein |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| pak6 | <i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6</i> |
| PAMP | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered solution</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PFU | <i>Plaque forming unit</i> |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat |
| PKR | <i>Protein kinase RNA-activated</i> |

| | |
|---------------|---|
| PRR | <i>Pattern recognition receptor</i> |
| pTEFb | Positiver Transkriptionselongationsfaktor b |
| qRT-PCR | Quantitative <i>realtime</i> PCR |
| Rab5 | <i>Ras-related protein Rab5</i> |
| RAD23A | <i>UV excision repair protein RAD23 homolog A</i> |
| RIG-I | <i>Retinoic acid-inducible gene-I</i> |
| RING | <i>Really interesting new gene</i> |
| rLACV | Rekombinantes LACV |
| RLR | <i>RIG-I-like receptor</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAPI/II/III | RNA-Polymerase I/II/III |
| RNP | Ribonukleoprotein |
| rRNA | Ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptions-PCR |
| Rtr1 | <i>RNA polymerase II CTD phosphatase Rtr1</i> |
| RVFV | Rift-Valley-Fieber-Virus |
| SA | Südamerika |
| SAP30 | Sin3A-assoziiertes Protein, 30 kDa |
| SBV | Schmallenberg-Virus |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| sec | Sekunden |
| Ser | Serin |
| siRNA | <i>Short interfering RNA</i> |
| snoRNA | <i>Small nucleolar RNA</i> |
| snRNA | <i>Small nuclear RNA</i> |
| ss | <i>Single-stranded</i> |
| SSU72 | <i>SSU72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog</i> |
| STAT | <i>Signal transducers and activators of transcription</i> |
| TCA | <i>Trichloroacetic acid</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin |
| TFIID/H | Transkriptionsfaktor IID/H |
| TGN | Trans-Golgi-Netzwerk |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TOT | Transovariale Transmission |
| TPR | <i>Tetratricopeptid repeat</i> |
| TRAF | <i>TNF receptor-associated factor</i> |
| TRIF | <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i> |

| | |
|---------------|---|
| tRNA | <i>Transfer RNA</i> |
| TUBEs | <i>Tandem ubiquitin binding entities</i> |
| U | <i>Unit</i> |
| Ub | Ubiquitin |
| UBA | Ubiquitin-assoziierte Domäne |
| UTR | <i>Untranslated region</i> |
| UV | Ultraviolett |
| Viperin | <i>Virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible</i> |
| vRNA | Virale RNA |
| VSV | Vesikuläres-Stomatitis-Virus |
| w/o | <i>without</i> |
| WE | Westeuropa |
| WT | Wildtyp |
| XBP | X-Box-bindendes Protein |
| α -ama | α -Amanitin |

Abbildungsverzeichnis- und Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 3.1: Schematische Abbildung eines LACV-Partikels und Kodierungsstrategie des Virus | 9 |
| Abbildung 3.2: Schematische Abbildung des Replikationszyklus der Bunyaviren | 12 |
| Abbildung 3.3: Eingeführte Mutationen im S-Segment und Interferon-Inhibition durch das LACV-NSs-Protein..... | 17 |
| Abbildung 3.4: Abbau der RNA-Polymerase II durch das LACV-NSs-Protein | 17 |
| Abbildung 3.5: Merkmale der DNA-Schadensantwort, die auch durch LACV-NSs induziert werden | 18 |
| Abbildung 3.6: CTD-Zyklus der RNA-Polymerase II, Laufverhalten der Rpb1-Untereinheit in einem SDS-Gel und Einfluss des LACV-NSs-Proteins auf die Rpb1-Untereinheit..... | 21 |
| Abbildung 3.7: Ubiquitin-Konjugationsweg | 24 |
| Abbildung 3.8: Ubiquitin-Ligation an ein Proteinsubstrat durch eine HECT-Ubiquitin-Ligase und Struktur von Nedd4..... | 25 |
| Abbildung 7.1: Virusverifizierung von LACV WT und rLACVdelNSs durch EcoRI-Enzymverdau und Sequenzierung..... | 60 |
| Abbildung 7.2: Rpb1-Abbau durch LACV WT | 61 |
| Abbildung 7.3: Reduktion der <i>de novo messenger</i> RNA-Synthese durch LACV WT..... | 62 |
| Abbildung 7.4: Interferon-Inhibition durch LACV WT | 63 |
| Abbildung 7.5: Zeitverlauf des Rpb1-Abbaus durch LACV WT..... | 64 |
| Abbildung 7.6: Inhibition des LACV-NSs induzierten Rpb1-Abbaus durch MG132..... | 65 |
| Abbildung 7.7: Analyse des Ubiquitin-Status in LACV-infizierten Zellen mittels Ubiquitin-Pulldown..... | 67 |
| Abbildung 7.8: Induktion von U2OS-Ubiquitin-Zellen..... | 69 |
| Abbildung 7.9: Infektion von U2OS-Ubiquitin-Zellen und Analyse mittels qRT-PCR | 71 |
| Abbildung 7.10: Analyse der ISG56-Induktion in LACV-infizierten U2OS-Ubiquitin-Zellen | 72 |
| Abbildung 7.11: Infektion von U2OS-Ubiquitin-Zellen und Analyse mittels Western-Blot | 73 |
| Abbildung 7.12: Analyse der LACV-Replikation in U2OS-Ubiquitin-Zellen..... | 73 |
| Abbildung 7.13: Analyse der Ubiquitin-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen mittels Ubiquitin-Pulldown..... | 74 |
| Abbildung 7.14: Analyse des Ubiquitin-Status in LACV-infizierten Zellen ohne Ubiquitin-Pulldown | 75 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 7.15: Analyse der Ubiquitin-K48-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen ohne Ubiquitin-Pulldown..... | 76 |
| Abbildung 7.16: Analyse der Ubiquitin-K63-Verlinkung in LACV-infizierten Zellen ohne Ubiquitin-Pulldown..... | 77 |
| Abbildung 7.17: Analyse der Ubiquitinylierung von Rpb1 in LACV-infizierten Zellen mittels Ubiquitin-Pulldown | 78 |
| Abbildung 7.18: Effekt eines Nedd4-Knockdowns auf den Rpb1-Abbau durch LACV WT | 80 |
| Abbildung 7.19: Effekt eines Nedd4-Knockdowns auf die IFN-Inhibition durch LACV WT | 82 |
| Abbildung 7.20: Intrazelluläre Verteilung von Nedd4 während einer LACV-Infektion | 83 |
| Abbildung 7.21: Intrazelluläre Verteilung einer Ligase-inaktiven Form von Nedd4 während einer LACV-Infektion..... | 84 |
| Abbildung 7.22: qRT-PCR als Kontrolle für den Microarray | 86 |
| Abbildung 7.23: Durch Doxorubicin herunterregulierte Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse | 87 |
| Abbildung 7.24: Durch rLACVdelNSs hochregulierte Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse | 88 |
| Abbildung 7.25: Durch LACV WT hochregulierte Proteine in der cDNA-Microarray-Analyse | 89 |
| Abbildung 7.26: Immunologisches Netzwerk in rLACVdelNSs-infizierten Zellen..... | 91 |
| Abbildung 7.27: Immunologisches Netzwerk in LACV WT-infizierten Zellen..... | 92 |
| Abbildung 7.28: Induktion der 7SK-RNA durch LACV..... | 94 |
| Abbildung 7.29: Induktion der 7SK-RNA durch andere Viren | 95 |
| Abbildung 7.30: Effekt eines 7SK-RNA-Knockdowns auf die ISG56-Inhibition durch LACV WT.. | 96 |
| Abbildung 8.1: Einfluss einer Chk-Inhibition oder einer Koffein-Behandlung auf den Rpb1-Abbau durch LACV WT..... | 104 |
| Abbildung 8.2: Effekt eines 7SK-RNA-Knockdowns auf den Abbau von Rpb1 durch LACV WT | 108 |
| Abbildung 0.1: Schmelzkurven der Primer für exogenes und endogenes Ubiquitin der U2OS-Ubiquitin-Zellen..... | 130 |
| | |
| Tabelle 3.1: Ausgewählte Pathogene der Familie der Bunyaviridae..... | 4 |
| Tabelle 6.1: Reaktionsansatz und PCR-Programm für Mycoplasmen-Test..... | 47 |
| Tabelle 6.2: Reaktionsansatz und PCR-Programm für eine qPCR-Reaktion mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen..... | 52 |
| Tabelle 6.3: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE für zwei Gele.... | 53 |

Anhang

A. Etablierung einer qRT-PCR für den Nachweis von endogenem und exogenem Ubiquitin in U2OS-Ubiquitin-Zellen

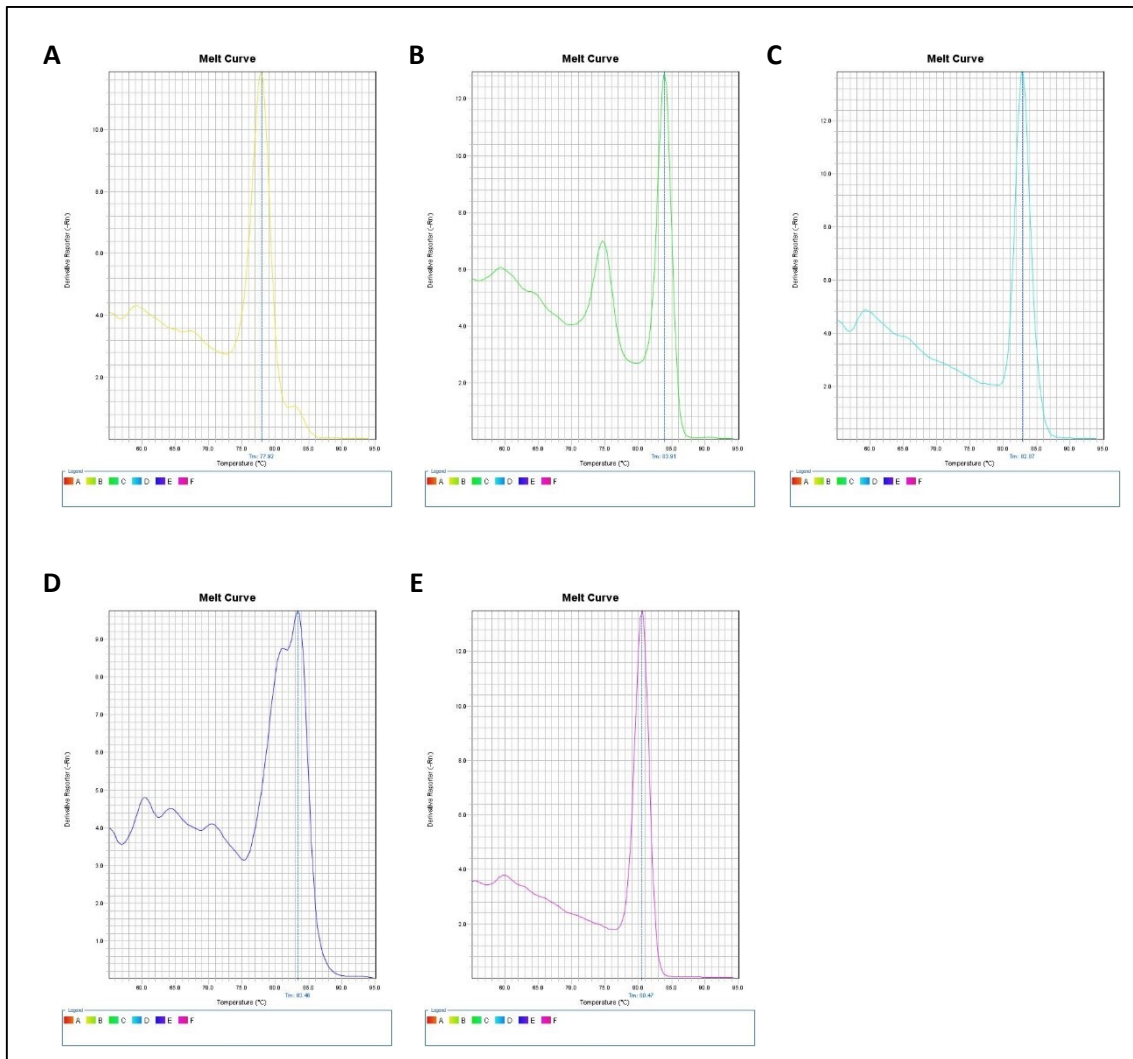


Abbildung 0.1: Schmelzkurven der Primer für exogenes und endogenes Ubiquitin der U2OS-Ubiquitin-Zellen

U2OS-Ubiquitin-Zellen wurden für 4 Tage mit 1 µg/ml Tetracyclin induziert, dann lysiert und mittels qRT-PCR analysiert. Es wurde eine Schmelzkurve für die verwendeten Primer erstellt. **A.** Exogenes Ubiquitin. **B.** UBA52. **C.** UBB. **D.** UBC. **E.** RPS27A. Nur die Schmelzkurven für exogenes Ubiquitin, UBB und RPS27A zeigen einen eindeutigen Peak und wurden für weitere Analysen verwendet.

B. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren der Philipps-Universität Marburg:

Bauer U., Bauer S., Becker, Brehm, Daut, Del Rey, Eilers, Elsässer, Feuser, Frenking, Garten, Glorius, Hasilik, Hassel, Huber, Jacob, Jänsch, Jungclas, Klenk, Koolman, Lill, Löffler M., Löffler G., Lohoff, Lüers, Maisner, Matrosovich, Müller, Müller-Brüsselbach, Petz, Röhm, Schäfer, Schwarz, Seitz, Suske, Voigt, Weber, Weihe, Westermann.

C. Publikationen und Tagungsbeiträge

Im Rahmen der Doktorarbeit:

- | | |
|-----------|---|
| Sep. 2014 | The NSs protein of La Crosse virus: inhibiting the interferon response <u>Spiegelberg L.</u> , Weber F. (Poster, SFB593-Symposium Marburg) |
| Okt. 2013 | Proteasomal degradation of RNA polymerase II by the NSs protein of La Crosse virus and microarray analysis of the general host response in La Crosse virus infected cells <u>Spiegelberg L.</u> , Weber F. (Vortrag, SFB593 Retreat Kleinwalsertal) |
| Mär. 2013 | The E3 ubiquitin ligase Nedd4 is involved in the proteasomal degradation of RNA polymerase II by the virulence factor NSs of La Crosse virus <u>Spiegelberg L.</u> , Weber F. (Poster, GfV-Tagung Kiel) |
| Sep. 2012 | Ubiquitin-mediated degradation of RNA polymerase II by the virulence factor NSs of La Crosse virus <u>Spiegelberg L.</u> , Weber F. (Vortrag, GfV-Tagung Deidesheim) |
| Apr. 2012 | Ubiquitin-mediated degradation of RNA polymerase II by the virulence factor NSs of La Crosse virus <u>Spiegelberg L.</u> , Weber F. (Poster, SFB593-Symposium Marburg) |
| Mär. 2012 | Ubiquitin-mediated degradation of RNA polymerase II by the virulence factor NSs of La Crosse virus <u>Spiegelberg L.</u> , Weber F. (Poster, GfV-Tagung Essen) |
| Feb. 2012 | Degradation of RNA polymerase II by the NSs protein of La Crosse virus <u>Spiegelberg L.</u> , Weber F. (Vortrag, SFB593 Retreat Kleinwalsertal) |

Außerhalb der Doktorarbeit:

- Mai 2013 **Human cell tropism and innate immune system interactions of human respiratory coronavirus EMC compared to those of severe acute respiratory syndrome coronavirus**
Zielecki F., Weber M., Eickmann M., Spiegelberg L., Zaki A.M., Matrosovich M., Becker S., Weber F. (*Journal of Virology*)
- Dez. 2011 **Genus-specific recruitment of filovirus ribonucleoprotein complexes into budding particles**
Spiegelberg L., Wahl-Jensen V., Kolesnikova L., Feldmann H., Becker S., Hoenen T. (*Journal of General Virology*)

In Vorbereitung:

The ubiquitin-proteasome system and the ubiquitin E3 ligase Nedd4 are involved in the degradation of RNA polymerase II by the virulence factor NSs of La Crosse virus
Spiegelberg L., Weber F.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben und somit zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die gute Betreuung danke ich Prof. Dr. Friedemann Weber sehr.

Auch bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Weber möchte ich mich bedanken: Laura Busch, Stéphanie Devignot, Ulrike Felgenhauer, Markus Kainulainen, Simone Lau, Andreas Schön, Michaela Weber, Jennifer Würth, Julia Wulle, Florian Zielecki und alle Praktikanten, Bachelor- und Masterstudenten, die uns für kurze Zeit besucht haben. Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Simone Lau und Jennifer Würth für die vielen schönen Kaffeepausen, die Verteilung von Ratschlägen und die Unterstützung während der letzten Jahre.

Ich möchte mich auch bei der Arbeitsgruppe BSL-4 und ganz besonders bei dem EMLab-Team für die sehr gute Zusammenarbeit, die interessanten Einblicke und auch für den Spaß, den ich mit euch hatte, bedanken.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Virologie bedanke ich mich für den guten Zusammenhalt, die Hilfsbereitschaft und die tollen Sommerausflüge und Weihnachtsfeiern.

Für Kooperationen, Bereitstellung von Zellen und Plasmiden bedanke ich mich bei Michael Krause, Marco Mernberger, Lienhard Schmitz, Natalia Shcherbik, Dale S. Haines und Harald Wodrich. Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken, die diese Arbeit durch den SFB593 finanziell unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank geht an Jörg Claren, der mir in den letzten Jahren, wie eigentlich immer, mit Ratschlägen und langen Telefonaten beiseite gestanden hat.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei der Triest-Mädels-Gruppe, für die wunderbaren Tage in Triest und die tollen Treffen in Marburg, Frankfurt, Göttingen und hoffentlich auch noch in Münster.

Auch bei den Stammtisch-Mädels möchte ich mich sehr bedanken – unser Jahrestag wird mir immer in Erinnerung bleiben und ich danke euch für die Unterstützung, die ihr mir einfach schon durch unsere Stammtischabende gegeben habt.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben: meinen Eltern, meiner Schwester und Tobi. Ich bin euch unendlich dankbar für eure uneingeschränkte Unterstützung und euren Glauben an mich!